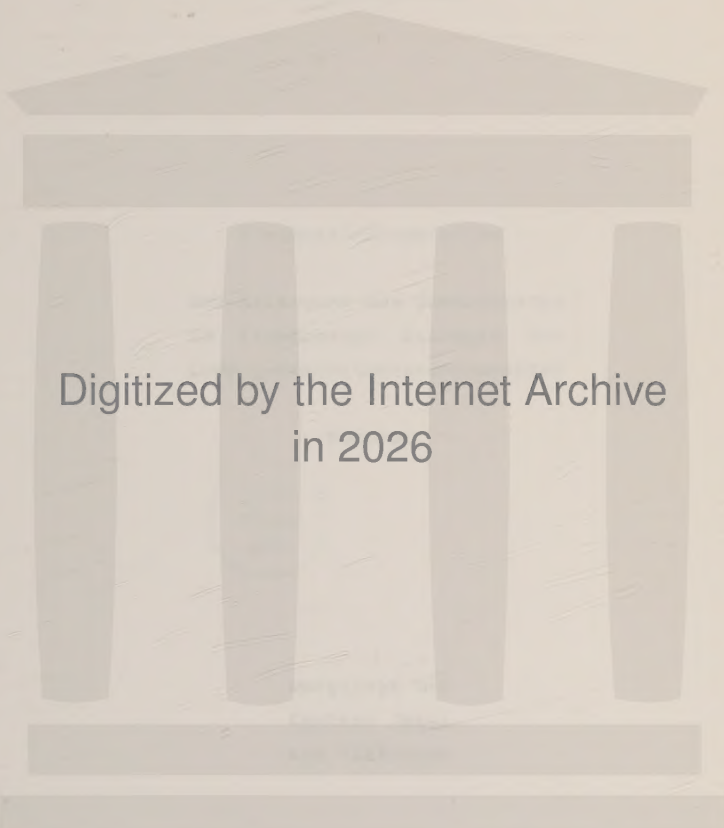


**Untersuchungen über den Ort der Biosynthese
der Komponenten des Mitochondrialen ATP ASE-Komplexes
aus Neurospora Crassa**

Gerhard Jackl

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551905_0028

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ORT DER BIOSYNTHESE DER KOM-
PONENTEN DES MITOCHONDRIALEN ATP ASE-KOMPLEXES AUS
NEUROSPORA CRASSA

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt von
Gerhard Jackl
aus Klästerac

München 1975



1. Berichterstatter: Prof Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
Tag der mündlichen Prüfung: 10.7.1975

Meiner Mutter

Meiner Mutter

Ich bedanke mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Walter Sebald für die ausgezeichneten Ratschläge und für die Hilfe bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit. Ebenso bin ich Frau Inge Küntze für ihre geschickte technische Assistenz und Herrn Axel von Rücker für die Korrektur des vorliegenden Manuskriptes dankbar.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Theodor Bücher danke ich für sein großes Interesse und für die Förderung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Beteiligung der mitochondrialen Proteinsynthese an der Biogenese von Enzymen der mitochondrialen Innenmembran	
1.2. Allgemeine Beschreibung der mitochondrialen Oligomycin-sensitiven ATPase	2
1.3. Bisherige Untersuchungen über den Ort der Synthese der Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Rinderherz und Hefe	5
2. PLAN	7
2.1. Präparation des mitochondrialen ATPase-Komplexes	
2.2. Untersuchungen über den Ort der Synthese der mit der mitochondrialen ATPase assoziierten Polypeptide	8
3. ERGEBNISSE	9
3.1. Eigenschaften der membrangebundenen ATPase	
3.2. Präparation der F_1 -ATPase und Charakterisierung des Enzyms mit Hilfe der Gelelektrophorese	10
3.3. Isolation des ATPase-Komplexes mit Hilfe von Antiserum gegen F_1 -ATPase und Charakterisierung des Immunpräzipitats mit Hilfe der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese	12

	Seite
3.3.1. Vorbemerkungen	
3.3.2. Immunpräzipitation des ATPase-Komplexes aus Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien	14
3.3.3. Gelelektrophoretische Analyse des Immunpräzipitats	16
3.3.4. Vergleich der Molekulargewichte der mit Antiserum gegen F_1 -ATPase präzipitierten Polypeptide mit denen der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Rinderherz und Hefe	21
3.4. Untersuchungen über den Ort der Synthese der mit der mitochondrialen ATPase assoziierten Polypeptide	25
3.4.1. Vorbemerkungen	
3.4.2. Einbau radioaktiven Leucins in Gegenwart von Cycloheximid	26
3.4.3. Einbau der radioaktiven Aminosäure in Gegenwart von Chloramphenicol	33
3.5. Vergleich der elektrophoretischen Mobilitäten der mitochondrial synthetisierten Komponenten des ATPase-Komplexes mit denen der Komponenten der Cytochromoxidase	37
4. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	39
4.1. Gelelektrophoretische Charakterisierung der F_1 -ATPase aus <u>Neurospora crassa</u>	
4.2. Charakterisierung des mit Antiserum gegen F_1 -ATPase präzipitierten ATPase-Komplexes	40

4.3.	Über den Ort der Synthese der mit der mitochondrialen ATPase assoziierten Polypeptide	41
4.4.	Über die Zahl der an mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase	
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	46
5.1.	Züchtung von <u>Neurospora crassa</u>	
5.2.	Markierung der Mycelien	
5.3.	Isolation der Mitochondrien	
5.4.	Bestimmung der ATPase-Aktivität	
5.5.	Präparation der F_1 -ATPase	47
5.6.	Präparation der Cytochromoxidase	49
5.7.	Präparation von Antiserum	
5.8.	Immunpräzipitation	
5.9.	Dodecylsulfat-Gelelektrophorese	
5.10.	Radioaktivitätsmessungen	52
5.11.	Proteinbestimmung	
5.12.	Materialien	
6.	ZUSAMMENFASSUNG	54
7.	LITERATURVERZEICHNIS	55
8.	LEBENS LAUF	64

1. EINLEITUNG

1.1. Beteiligung der mitochondrialen Proteinsynthese an der Biogenese von Enzymen der mitochondrialen Innenmembran

Mitochondrien enthalten eine eigene DNS und einen vollständigen Apparat zur Transkription und Translation der auf dem mitochondrialen Genom gespeicherten Information (siehe Übersichtsartikel : Ashwell (1), Beattie (2), Borst (3) und Schatz (4).

Das mitochondriale System der Proteinsynthese produziert jedoch nur einen geringen Prozentsatz der Proteine der mitochondrialen Innenmembran. Alle anderen Proteine, die der Matrix, der Aussenmembran und die meisten Proteine der Innenmembran steuert das cytoplasmatische System bei (5, 6).

Trotzdem ist der Beitrag der mitochondrialen Proteinsynthese essentiell für die Ausbildung wichtiger Funktionen der Organelle, nämlich der Atmung und Phosphorylierung. So führen Mutationen der mitochondrialen DNS (7-9) und spezifische Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese (10) dazu, daß einige Enzyme, die an der Atmungskettenphosphorylierung beteiligt sind, nicht mehr gebildet werden können. Daher wurde vermutet, daß mitochondrial synthetisierte Polypeptide wesentliche Bestandteile dieser Enzyme sind.

In der Tat konnten in den letzten Jahren einige Enzymkomplexe der Innenmembran isoliert werden, die mitochondrial synthetisierte Komponenten enthalten. Bei der Biogenese dieser Enzyme kooperiert das mitochondriale System mit dem cytoplasmatischen. In der Cytochromoxidase aus Neurospora crassa (11,12) und aus Saccharomyces cerevisiae (13,14) sind drei mitochondrial synthetisierte Komponenten in äquimolaren Verhältnissen mit vier Komponenten

assoziiert, die aus dem Cytoplasma importiert werden. Das Enzym kann nicht gebildet werden, wenn eines der beiden Systeme der Proteinsynthese ausgeschaltet wird (11,12,15).

Weiterhin wurde ein mitochondrial synthetisiertes Polypeptid in einer Präparation von Cytochrom b aus Neurospora crassa (16) nachgewiesen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere mitochondrial synthetisierte Polypeptide aus Neurospora crassa zu identifizieren. Daher wurde die Struktur und Biogenese des mitochondrialen ATPase-Komplexes untersucht.

In einer Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Saccharomyces cerevisiae (17) wurden vier mitochondriale Produkte identifiziert.

1.2. Allgemeine Beschreibung der mitochondrialen Oligomycin-sensitiven ATPase

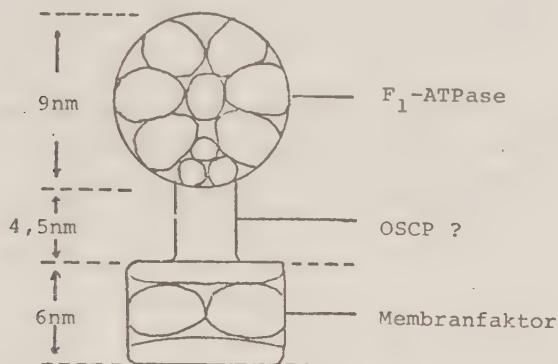
Untersuchungen an Mitochondrien aus Rinderherz und Saccharomyces cerevisiae haben ergeben, daß die mitochondriale ATPase als terminales Enzym der Atmungskettenphosphorylierung folgende Reaktion katalysiert:



Das isolierte Enzym spaltet ATP. Es ist aber anzunehmen, daß es in vivo als ATP- Synthetase wirkt (Übersichtsartikel: Senior (18)).

Das Enzym ist hemmbar durch Oligomycin und Rutamycin, eine Komponente des Oligomycins, und wird daher als Oligomycin-sensitive oder auch als Rutamycin-sensitive ATPase bezeichnet (19). Es ist fest in der Innenmembran verankert und kann nur mit Hilfe von Detergentien, z.B. Triton X-100 oder Desoxycholat solubilisiert werden. Es wurde bisher aus Rinderherz (20-22) und Hefe (23,19) isoliert und charakterisiert. Der Enzymkomplex kann in drei funktionelle Untereinheiten zerlegt werden. Eine schematische

Darstellung des Enzymkomplexes, (entnommen aus: Structure of Mitochondrial ATPase, Senior (18)) wird im Folgenden gegeben;



F₁-ATPase

Die F₁-ATPase ist membrangebunden. Sie kann aber mit Hilfe physikalischer Methoden von der Membran abgespalten werden. Das Enzym ist dann wasserlöslich, nicht mehr hemmbar durch Oligomycin und hat die ungewöhnliche Eigenschaft unterhalb von 10° C in seine Polypeptiduntereinheiten zu zerfallen und dabei irreversibel inaktiviert zu werden (24).

Das Enzym wurde das erste Mal von Pullman (25) aus Rinderherzmitochondrien isoliert, die durch Schütteln mit Glasperlen aufgeschlossen wurden. Seither wurde es nach verschiedenen Methoden, durch Behandlung der mitochondrialen Membranen mit Ultraschall oder durch lange Beschallung bei pH 9,2 solubilisiert. Es wurde bisher aus Rinderherz (26, 27), Rattenleber (28, 29) und Hefe (30, 23) präpariert.

Das Enzym hat einen Durchmesser von 90 Å und ist identisch mit den "Knöpfchen", die bei elektronenoptischen Aufnahmen an der der Matrix zugewendeten Seite der mitochondrialen Innenmembran beobachtet werden können (31,32).

Es hat ein Molekulargewicht von 360 000 Dalton (33) und eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung wie die ATP-Phosphohydrolasen aus Bakterien (34) und Chloroplasten (35), (CF_1 - ATPase).

OSCP

Bei Extraktion der Membranen mit Ammoniak wird ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 18 000 Dalton herausgelöst, das Oligomycin-Sensitivity-Confering-Protein, (OSCP). Es ist notwendig für die Bindung der F_1 -ATPase an die Membran (36-40).

Membranfaktor

F_1 -ATPase und OSCP können durch sukzessive Inkubation der Membranen mit NaBr (NaCl oder Harnstoff) und Ammoniak vollständig aus der mitochondrialen Innenmembran extrahiert werden (36-40). Inkubiert man diese Membranen mit Präparationen von OSCP und F_1 -ATPase, so wird eine Oligomycin-sensitive ATPase rekonstituiert. Notwendig für die feste Verankerung der F_1 -ATPase und die Hemmbarkeit durch Oligomycin ist ein hydrophober Bereich der Innenmembran, der von Tzagoloff als Membranfaktor bezeichnet wird (41). Dieser Membranfaktor besteht wahrscheinlich aus mehreren Polypeptiden und Phospholipiden.

Die drei funktionellen Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase sind sehr fest assoziiert. So konnte im Fall von Saccharomyces cerevisiae nachgewiesen werden, daß Antiserum gegen F_1 -ATPase den gesamten Komplex der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Triton X-100 solubilisierten Membranen ausfällt (17).

1.3. Bisherige Untersuchungen über den Ort der Synthese der Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Rinderherz und Hefe

Da es selektive Hemmstoffe für die beiden Systeme der Proteinsynthese gibt, können die Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese von denen der cytoplasmatischen unterschieden werden. So hemmt Cycloheximid die cytoplasmatische Proteinsynthese, aber nicht die Synthese in den Mitochondrien (42). Dagegen hemmt Chloramphenicol spezifisch die mitochondrialen Ribosomen (43,44).

Die F_1 -ATPase wird außerhalb der Mitochondrien synthetisiert. Ihre Synthese wird durch Cycloheximid vollständig gehemmt (10). Sie ist vorhanden in den cytoplasmatischen "Petite" - Mutanten der Hefe (8), deren mitochondriale DNS teilweise oder vollständig verloren gegangen ist und in Zellen, die in Gegenwart von Chloramphenicol kultiviert werden (10). Ebenso wird das OSCP in Gegenwart von Chloramphenicol synthetisiert (40).

Jedoch ist die mitochondriale ATPase der "Petite"-Mutanten und der Zellen, die in Gegenwart von Chloramphenicol kultiviert werden, nicht mehr hemmbar durch Oligomycin und kann leicht durch milde Behandlung der Membranen mit Ultraschall abgespalten werden (8). Dieser Befund weist darauf hin, daß mitochondriale Produkte notwendig sind für die feste Verankerung der F_1 -ATPase in der Membran und für die Hemmbarkeit durch Oligomycin.

Tzagoloff gelang es, für dereprimierende Hefe nachzuweisen, daß das mitochondriale System der Proteinsynthese einen wesentlichen Beitrag zur Biosynthese des Membranfaktors leistet (15).

Wenn das Derepressionsmedium Chloramphenicol oder Cycloheximid enthält (15), kann der Membranfaktor nicht gebil-

det werden. Wird jedoch zuerst mit Chloramphenicol und dann mit Cycloheximid inkubiert, so wird der Faktor gebildet.

Daraus wurde geschlossen, daß Polypeptid-Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden.

In der Tat konnten in einer Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase vier mitochondriale Translationsprodukte nachgewiesen werden (17).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß mindestens zwei Komponenten des mitochondrialen ATPase-Komplexes aus Neurospora crassa in den Mitochondrien synthetisiert werden.

2. PLAN

2.1. Präparation des mitochondrialen ATPase-Komplexes

Es wurde versucht, die Oligomycin-sensitive ATPase aus Neurospora crassa nach den in der Literatur beschriebenen Methoden für das Enzym aus Rinderherz (19) und Hefe (22) zu präparieren. Bei der Extraktion der mitochondrialen Partikel aus Hefe mit Triton X-100 wird eine starke Anreicherung der Enzymaktivität erhalten. Das Enzym kann dann aufgrund seines hohen Molekulargewichtes durch Zentrifugation durch einen Dichtegradienten isoliert werden. Bei der Extraktion der Partikel aus Neurospora crassa wurde jedoch keine Anreicherung erreicht und es gelang nicht, durch Gradientenzentrifugation eine hochgereinigte Präparation des Enzyms zu erhalten.

Außerdem wurde versucht, durch Affinitätschromatographie des Extraktes durch Sepharose, an die kovalent der endogene Inhibitor der mitochondrialen ATPase gebunden war (22), das Enzym zu isolieren. Auch mit dieser Methode konnte keine homogene Enzympräparation gewonnen werden.

Dagegen gelang es mit Hilfe immunologischer Methoden einen definierten Komplex mitochondrialer Proteine zu isolieren. Dieser weist ein Polypeptidmuster auf, das den der in der Literatur beschriebenen Präparationen der Oligomycin-sensitiven ATPase gleicht. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Die lösliche F_1 -ATPase wurde isoliert und Antiserum gewonnen. Der ATPase-Komplex wurde aus Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde mit Hilfe der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese charakterisiert und das erhaltene Polypeptidmuster wurde mit dem der Präparationen der Oligomycin-sensitiven ATPase verglichen.

2.2. Untersuchungen über den Ort der Synthese der mit der mitochondrialen ATPase assoziierten Polypeptide

Die mitochondrialen Proteine wurden in vivo in Gegenwart spezifischer Inhibitoren der cytoplasmatischen (Cycloheximid) oder mitochondrialen (Chloramphenicol) Proteinsynthese mit radioaktiven Aminosäuren markiert. Das Immunpräzipitat wurde isoliert und mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert. Der Synthesort der getrennten Polypeptide wurde aufgrund der spezifischen Markierung ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Eigenschaften der membrangebundenen mitochondrialen ATPase

Die membrangebundene mitochondriale ATPase aus Neurospora crassa hat ähnliche Eigenschaften, wie die aus Rinderherz und Hefe. Das Enzym ist in der Kälte stabil, nennbar durch Oligomycin, ADP und den Pullman-Monroy-Inhibitor. Der Pullman-Monroy-Inhibitor ist ein kleines Protein, das aus Rinderherzmitochondrien extrahiert werden kann (45). Ein Inhibitor der mitochondrialen ATPase konnte aus Neurospora nach der Methode von Horstman et. al. (46) angereichert werden. Er hemmt ebenso wie der Pullman-Monroy-Inhibitor die membrangebundene ATPase aus Neurospora zu ca. 90 % (Abb.1).

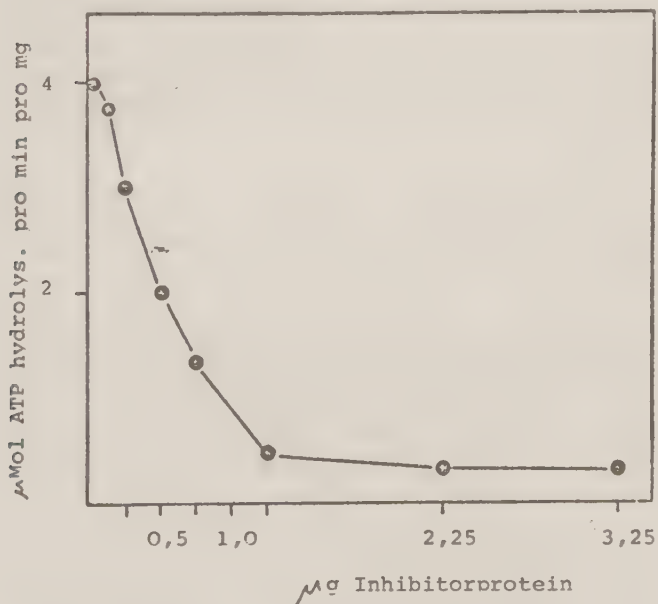


Abb.1. Hemmung der membrangebundenen ATPase mit dem aus Neurospora angereicherten Inhibitor
Partikel (0,5 mg, spezifische Aktivität 4 U/mg) wurden nach der Methode von Horstman et.al.(46) 20 min bei Raumtemperatur mit steigenden Mengen an Inhibitorprotein inkubiert.

Die spezifische Aktivität der partikulären ATPase liegt bei 0,7 bis 2 U/mg (μ Mol ATP hydrolysiert pro min pro mg Protein). Submitochondriale Partikel mit einer hohen spezifischen Aktivität werden erhalten, wenn die Mitochondrien mit Ultraschall zerrissen und anschließend in salzhaltigem Puffer nach der Methode von Racker et.al. (47) über eine Sephadex-G-50 Säule filtriert werden. Die eluierten Partikel haben spezifische Aktivitäten von 2,5 bis 4,4 U/mg. Wahrscheinlich wird bei der Gelfiltration der endogene ATPase-Inhibitor entfernt (47).

3.2. Präparationen der F_1 -ATPase und Charakterisierung des Enzyms mit Hilfe der Gelelektrophorese

Die F_1 -ATPase wurde nach einer modifizierten Methode von Senior und Brooks (27) präpariert. Bei dieser Methode wird die Abspaltung des Enzyms von der Membran durch eine vorhergehende Inkubation der mitochondrialen Partikel bei pH 9,2 erleichtert.

Allgemeine Beschreibung des Verfahrens:

- a) Durch kurzzeitige Behandlung der Mitochondrien mit Ultraschall bei 4° C und neutralem pH werden Partikel erhalten.
 - b) Die Partikel werden über Nacht bei pH 9,2 und Raumtemperatur inkubiert. Die F_1 -ATPase wird bei 50° C mit Ultraschall von der Membran abgesprengt.
 - c) Die Proteinsuspension wird mit Ammoniumsulfat fraktioniert und das Enzym wird ausgefällt.
 - d) Die Enzympräparation wird weiter durch Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie gereinigt.
- (Nähere Einzelheiten siehe S. 47)

In Tabelle 1 ist die Anreicherung der ATPase-Aktivität bei der Präparation des Enzyms wiedergegeben.

Tabelle 1

Präparation der F_1 -ATPase, Anreicherung der spezifischen
ATPase-Aktivität

Fraktion	Protein (mg)	Aktivität, insgesamt (U)	spezifische Aktivität (U/mg) r_s
Mitochondrien	7 200	6 912	0,96
Partikel	2 370	6 731	2,84
Proteinsuspension nach Beschallung bei pH 9,2	2 370	4 716	1,99
Ammoniumsulfat- präzipitat	49	2 989	61,0
Ionenaustauscher- eluat	15	1 110	74,0

Die Enzympräparationen hatten spezifische Aktivitäten von 60 bis 100 U/mg. Die Schwankung der Enzymaktivitäten in den einzelnen Präparationen können damit erklärt werden, daß sie nicht frei von ATPase-Inhibitor waren oder das Enzym teilweise denaturiert war.

Das Enzym wird in der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese in 5 Polypeptidfraktionen mit den Molekulargewichten 59 000, 56 000, 36 000, 15 000 und 12 000 Dalton aufgetrennt (Abb.2).

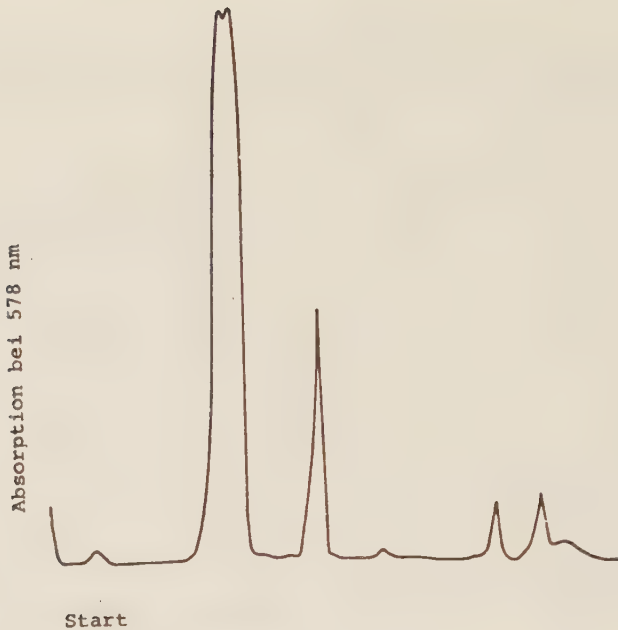


Abb.2. Densitogramm einer in der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese getrennten und mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbten Präparation der F_1 -ATPase

3.3. Isolation des ATPase-Komplexes mit Hilfe von Antiserum gegen F_1 -ATPase und Charakterisierung des Immunpräzipitats mit Hilfe der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese

3.3.1. Vorbemerkungen

Die unlöslichen Proteine der mitochondrialen Innenmembran können mit Detergentien solubilisiert werden. Starke Detergentien, wie Dodecylsulfat, dissoziieren die Membran dabei vollständig in ihre Polypeptiduntereinheiten. Dagegen werden die Polypeptid-Komplexe der

an der Atmungskettenphosphorylierung beteiligten Enzyme bei der Solubilisierung der Membran mit milden Detergentien wie z.B. Triton X-100 oder Desoxycholat nicht zerstört. Dies gilt sowohl für Cytochromoxidase aus *Neurospora* (11,12), Hefe (13,14) und Rinderherz (41), wie auch für die Oligomycin-sensitive ATPase aus Rinderherz (21,22) und Hefe (19,23).

Die Oligomycin-sensitive ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* kann bei einer niedrigen Tritonkonzentration (0,5 % Triton, 6 mg Protein pro ml) nahezu quantitativ aus der Membran extrahiert werden. Dabei wird eine etwa fünffache Anreicherung der Enzymaktivität erhalten (19).

Im Fall von *Neurospora crassa* dagegen konnte keine spezifische Extraktion erreicht werden. Um den Enzymkomplex quantitativ zu solubilisieren, war es notwendig, bei hoher Tritonkonzentration zu lösen (1 % Triton X-100, 2 mg Protein pro ml). Unter diesen Bedingungen geht die Hemmbarkeit durch Oligomycin verloren. Sie kann wiederhergestellt werden, wenn der Komplex durch einen Phospholipid-enthaltenden Glyceringradienten zentrifugiert wird (48). Dieser Befund spricht dafür, daß Phospholipide, die bei der Solubilisierung herausgelöst werden, für die Hemmbarkeit der ATPase durch Oligomycin notwendig sind.

In der Tat wurde für eine Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Rinderherz (49), die durch Waschen mit tritonhaltigem Puffer inaktiviert worden war, gezeigt, daß die Enzymaktivität und Oligomycin-Hemmbarkeit durch Inkubation mit Phospholipiden reaktiviert werden kann.

Aus diesen Gründen wird vermutet, daß auch bei der hohen Tritonkonzentration, bei der der ATPase-Komplex aus *Neurospora* solubilisiert wird, keine Polypeptiduntereinheiten abgespalten werden.

Um Hinweise zu erhalten, ob Antiserum gegen F_1 -ATPase den gesamten Komplex der Oligomycin-sensitiven ATPase immunpräzipitiert, wird in Folgendem untersucht, ob ein definierter Komplex mitochondrialer Proteine ausgefällt wird und ein ähnliches Polypeptidmuster erhalten wird, wie bei den Präparationen der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Hefe und Rinderherz.

3.3.2. Immunpräzipitation des ATPase-Komplexes aus Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien

Im Folgenden bezeichne ich die mit radioaktiven Aminosäuren markierten Proteine als homogen markiert, wenn die Markierung in vivo in Abwesenheit von Inhibitoren der Proteinsynthese nach den im Exptl. Teil beschriebenen Bedingungen erfolgte.

Kaninchen wurden gegen F_1 -ATPase immunisiert und Antiserum wurde gewonnen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Immunpräzipitationen nach der Methode von Tzagloff (17) vorgenommen: Die Mitochondrienproteine wurden homogen mit radioaktivem Leucin markiert. Mitochondriale Partikel wurden präpariert und mit Triton X-100 extrahiert. Unlösliches Material wurde 20 min bei 165 000 x g abzentrifugiert und die Extrakte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Antiserum inkubiert. Das Immunpräzipitat wurde in der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese analysiert.

Bei dieser Isolationsmethode variierte das in der Gelelektrophorese erhaltene Bandenmuster des präzipitierten mitochondrialen Proteins von Experiment zu Experiment beträchtlich. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, daß die Proteine des ATPase-Komplexes leicht mit hydrophoben Proteinen der Membranen aggregieren.

Ein definiertes Bandenmuster konnte erst erhalten werden, wenn alle Schritte zur Isolation des Komplexes

bei 0-4°C vorgenommen wurden (d.h. auch die Immunpräzipitation) und wenn die dazu erforderliche Zeit drastisch reduziert wurde. Aus diesem Grund wurden nicht wie im Fall der Hefe (17) Partikel als Ausgangsmaterial zur Isolation genommen, sondern frisch präparierte Mitochondrien. Eine Zentrifugation bei 165 000 x g erwies sich als nicht notwendig, da die Mitochondrien quantitativ solubilisiert werden konnten. Weiterhin zeigte es sich, daß besonders saubere Präparate erhalten wurden, wenn in Gegenwart von 0,3 M KCl gefällt wurde.

Antiserum gegen F_1 -ATPase präzipitiert bei optimaler Konzentration (Abb.3.) 13-15 % des gesamten mitochondrialen Proteins (Bei dieser Angabe ist zu beachten, daß die Mitochondrien nicht durch Gradientenzentrifugation gereinigt wurden). Die Präzipitation ist spezifisch, da Kontrollserum maximal 0,3 % präzipitiert.

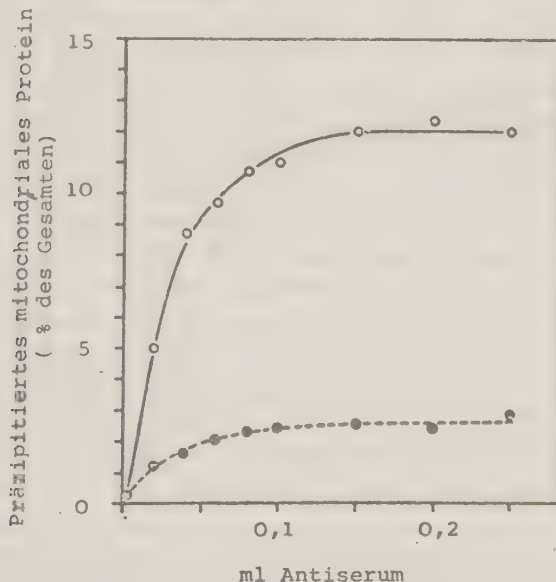


Abb.3. Titration der mit Hilfe von Triton X-100 solubilierten Mitochondrienproteine mit Antiserum gegen F_1 -ATPase

(Fortsetzung Seite 16)

Die mitochondrialen Proteine wurden in vivo mit ^{14}C -Leucin o--o markiert und danach in Gegenwart von Cycloheximid mit ^3H -Leucin (●--●) (Die genauen Markierungsbedingungen werden in Tabelle 4, Spalte 8 gegeben).

Proben der gelösten Proteine (0,25 ml) wurden mit gleichen Volumina an Serum inkubiert. Die auf der Abszisse angegebenen Mengen an Antiserum wurde durch Zugabe von Kontrollserum auf ein Endvolumen von 0,25 ml gebracht. Auf der Ordinate ist der Prozentsatz des präzipitierten radioaktiv markierten Proteins dargestellt. Auf die Markierung in Gegenwart von Cycloheximid wird in Kapitel 4. eingegangen.

3.3.3. Gelelektrophoretische Analyse des Immunpräzipitats

Um zu prüfen, ob Antiserum gegen F_1 -ATPase außer den Polypeptiden des Antigens den gesamten ATPase-Komplex immunpräzipitiert, wurden die Mitochondrienproteine in vivo homogen mit ^{14}C -Leucin markiert und zusammen mit einer homogen mit ^3H -Leucin markierten Präparation der F_1 -ATPase in der Gelelektrophorese getrennt. Die Radioaktivitätsverteilung über das Gel ist in Abb.4. dargestellt. Wie ersichtlich, werden außer den 5 Komponenten der F_1 -ATPase zahlreiche zusätzliche Polypeptide präzipitiert. Die ^{14}C -Markierung verteilt sich im Wesentlichen auf 7 Hauptbanden. Jedoch deuten Schultern in den verschiedenen gelelektrophoretischen Trennungen (siehe dazu auch die Abbildungen 5-9) an, daß einige Banden keine homogenen Polypeptidfraktionen repräsentieren. Eine bessere Auftrennung kann beobachtet werden, wenn die Gele mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt werden (Abb.4., oberer Teil).

Die nahe an der Auftragsstelle wandernde Proteinfraction enthält keine radioaktive Markierung. Es handelt sich dabei um das Antikörperprotein, das aufgrund seines hohen Molekular-

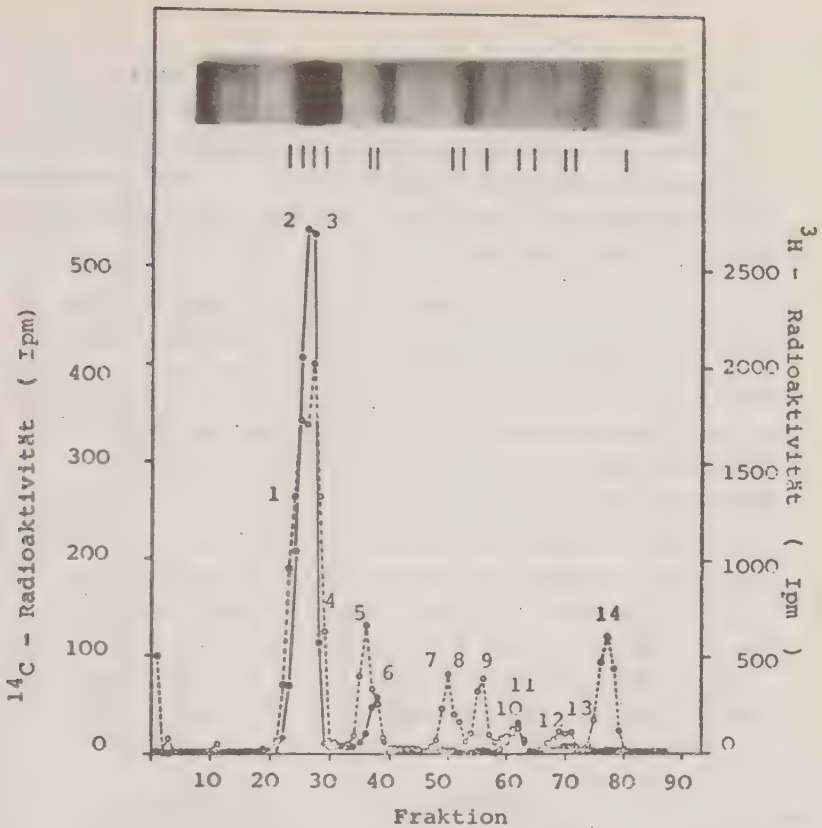


Abb. 4. Koelektrophorese der F_1 -ATPase (●-●) und des Immunpräzipitierten ATPase-Komplexes (○-○)

Der ATPase-Komplex wurde aus Zellen isoliert, die mit ^{14}C -Leucin (○-○) markiert waren. Die F_1 -ATPase wurde aus Zellen erhalten, die mit ^3H -Leucin markiert waren (●-●). Die beiden Proteine wurden in Dodecylsulfatlösung gelöst und gemeinsam in der Gelelektrophorese getrennt.

Im oberen Teil der Abbildung ist das Bandenmuster des ATPase-Komplexes dargestellt, das nach gelelektrophoretischer Trennung und Anfärben des Gels mit Coomassie-Blau erhalten wird.

gewichtes (150 000 Dalton) nur schlecht in das Gel einwandern kann (Die Disulfidbrücken der Globuline wurden in diesem Fall nicht mit Mercaptoäthanol reduziert). Die übrigen 14 gefärbten Banden können mit dem Markierungsmuster korreliert werden. In Abb.4. wird eine Numerierung der Polypeptidfraktionen gegeben.

Die Polypeptiduntereinheiten der F_1 -ATPase haben die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die Komponenten 2, 3, 6, 11, und 12 des präzipitierten ATPase-Komplexes.

Um die Zusammensetzung des ATPase-Komplexes aus mindestens 14 Polypeptiden zu bestätigen, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Die Zellproteine wurden gleichzeitig mit ^3H -Histidin und ^{14}C -Leucin markiert. Das Immunpräzipitat wurde mit Hilfe der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese analysiert. Wie in Abb.5. dargestellt, können die Komponenten 1, 2, 3 und 4, sowie die Komponenten 5 und 6 und die Komponenten 12 und 13 durch ihre unterschiedlichen Histidin und Leucin-verhältnisse unterschieden werden.

Der Anteil der ^{14}C -Markierung in den sieben Hauptbanden an der gesamten ^{14}C -Radioaktivität des Immunpräzipitates ist in Tabelle 2 dargestellt.

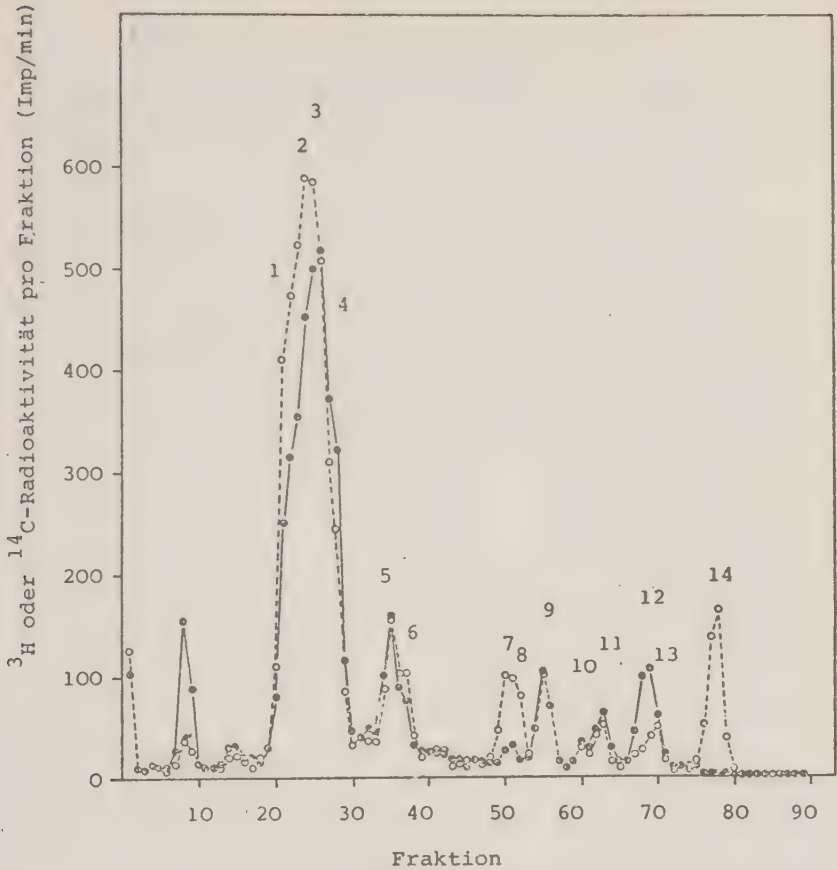


Abb. 5. Verteilung der homogenen ^{14}C -Leucin (o--o) und ^3H -Histidin (•--•) Markierung über die in der Gelelektrophorese getrennten Proteinfractionen des Immunpräzipitates

Die Zellen wurden gleichzeitig mit ^{14}C -Leucin und ^3H -Histidin markiert. Das Immunpräzipitat wurde isoliert und in der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese analysiert.

Tabelle 2

Prozentuale Verteilung der homogenen ^{14}C -Leucin Radioaktivität über die elektrophoretischen Fraktionen des Immunpräzipitats:

Die Werte basieren auf Untersuchungen von 12 verschiedenen Präparationen,

Komponente des präzipitierten ATPase-Komplexes	homogene ^{14}C -Leucin-Markierung (% des Gesamten)
1, 2, 3, 4	$52,4 \pm 1,5$
5, 6	$10,0 \pm 1,5$
7, 8	$9,0 \pm 1,1$
9	$6,7 \pm 0,8$
10, 11	$3,8 \pm 0,8$
12, 13	$4,8 \pm 1,0$
14	$13,1 \pm 2,6$

3.3.4. Vergleich der Molekulargewichte der mit Antiserum gegen F_1 -ATPase präzipitierten Polypeptide mit denen der Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Rinderherz und Hefe

Um Hinweise zu erhalten, ob der präzipitierte Komplex aus Neurospora crassa aus Polypeptiden mit ähnlichem Molekulargewicht zusammengesetzt ist wie die in der Literatur beschriebenen Präparationen der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Hefe (19) und Rinderherz (50), wurden die Molekulargewichte der in der Elektrophorese getrennten Polypeptide bestimmt. Wie ersichtlich (Tab.3.), haben die Komponenten des ATPase-Komplexes aus Neurospora crassa ähnliche Molekulargewichte wie die Untereinheiten der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Hefe und Rinderherz.

Der Komplex der mitochondrialen ATPase aus Neurospora crassa besteht aus mindestens 14 Proteinkomponenten. Dagegen geben die Autoren an, daß die Oligomycin-sensitive ATPase aus Hefe und Rinderherz aus 10 Komponenten zusammengesetzt ist. Die Unterschiede können dadurch erklärt werden, daß das in dieser Arbeit benutzte Elektrophoresesystem zu einer besseren Auftrennung der Polypeptiduntereinheiten führt. Eine Bestätigung dafür konnte durch Koelektrophorese einer Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Hefe und des ATPase-Komplexes aus Neurospora crassa gewonnen werden (Abb.6.).

Die Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Saccharomyces cerevisiae war mit ^{14}C -Leucin markiert, der ATPase-Komplex aus Neurospora mit ^3H -Leucin. Die von Izagoloff beschriebenen 10 Komponenten sind in Abb. 6. mit römischen Zahlen gekennzeichnet, die des ATPase-Komplexes aus Neurospora crassa mit arabischen.

Tabelle 3

Vergleich der scheinbaren Molekulargewichte der mit der mitochondrialen ATPase assoziierten Polypeptide aus Neurospora crassa mit denen der Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase, OSA, aus Rinderherz (50) und Hefe (19).

Immunpräzipitat aus N.cr.	OSA, Hefe (19)	OSA, Rinderherz (50)
------------------------------	----------------	----------------------

Bandennummer in Abb.4.		Komponente		
1	60 000			73 000
2	59 000 *	I	58 000 *	55 000 *
3	56 000 *	II	54 000 *	52 000 *
4	54 000			
5	38 000	III	36 500 *	30 000 *
6	36 000 *	IV	31 000 *	29 000
		V	29 000	
7	21 000	VI	22 000	20 000
8	20 000	VII	18 500	19 000
9	19 000			
10	16 000			
11	15 000 *	VIII _a	12 000	12 500 *
12	12 000 *	VIII _b	12 000 *	10 000
13	11 500			
14	Σ 8 000	IX	7 500	8 000 *

(*Die Komponenten der F₁ - ATPase).

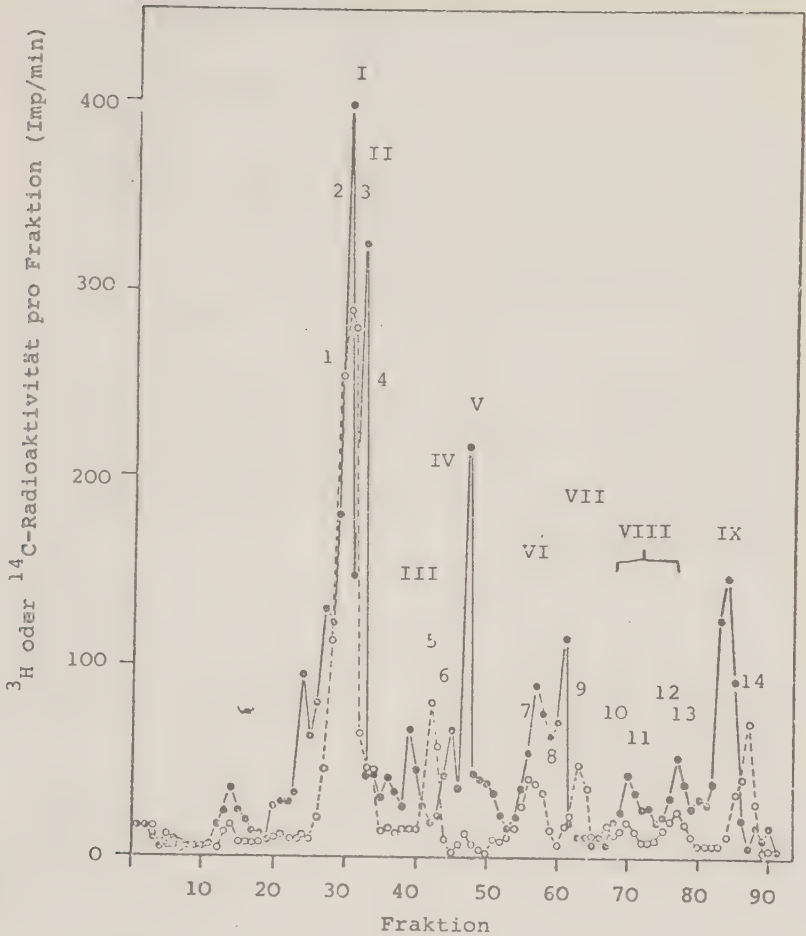


Abb.6. Koelektrophorese einer Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Hefe (●---●) und dem ATPase-Komplex aus Neurospora crassa (○---○).

(Die Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Saccharomyces cerevisiae wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Tzagoloff, New York, zur Verfügung gestellt).

Die Präparation aus Hefe war mit ^{14}C -Leucin (●---●), die aus Neurospora crassa mit ^3H -Leucin markiert (○---○).

Wie ersichtlich, bestehen die Komponenten I und II aus mindestens 4 Polypeptiden und haben ähnliche Molekulargewichte wie die Komponenten 1-4 aus *Neurospora*. Die Komponenten III und IV entsprechen wahrscheinlich den Komponenten 5 und 6. Ein Polypeptid mit dem gleichen Molekulargewicht wie Komponente V (29 000) ist zwar in einigen Präparationen des ATPase-Komplexes aus *Neurospora* vorhanden (siehe Abb.4-9), jedoch handelt es sich dabei vermutlich um eine Verunreinigung: Die Proteinmenge in dieser Fraktion nimmt zu, wenn der Enzymkomplex aus gealterten Mitochondrien isoliert wird.

Die Komponenten VI und VII laufen in der Elektrophorese ähnlich schnell wie die Komponenten 7, 8, und 9. Komponente VIII wird in 4 Polypeptidfraktionen aufgetrennt. Komponente IX hat ein geringfügig höheres Molekulargewicht als Komponente 14.

3.4. Untersuchungen über den Ort der Synthese der mit der mitochondrialen ATPase assoziierten Polypeptide

3.4.1. Vorbemerkungen

Um den Ort der Synthese der Komponenten des ATPase-Komplexes zu ermitteln, wurden die Mitochondrienproteine in Gegenwart spezifischer Inhibitoren der mitochondrialen (Chloramphenicol) und der cytoplasmatischen Proteinsynthese (Cycloheximid) markiert. Die Immunpräzipitate wurden isoliert und in der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese analysiert.

Um eine Markierung zu erreichen, wurden die gleichen Techniken angewendet, die für Untersuchungen über die Biogenese der Cytochromoxidase (11,12) entwickelt worden sind.

Für dieses Atmungskettenenzym, das aus cytoplasmatisch und mitochondrial synthetisierten Komponenten aufgebaut ist, wurde gezeigt, daß eine Assemblierung aus Untereinheiten in Gegenwart der genannten Inhibitoren nur solange möglich ist, bis der kleinste Pool einer Vorstufe erschöpft ist (51). Daraus ergibt sich die Schwierigkeit, daß in Gegenwart spezifischer Inhibitoren eines Systems der Proteinsynthese resistent markierte Vorstufen nur zu einem geringen Ausmaß zum funktionellen Enzym assembliert werden können. Dadurch erfolgt nur eine unzureichende Markierung der Untereinheiten im isolierten Enzym.

Diese Schwierigkeiten bei der spezifischen Markierung konnten im Fall der Cytochromoxidase durch folgende Methoden überwunden werden:

a) Beide Inhibitoren der Proteinsynthese können nach der Markierung durch Auswaschen aus den Zellen entfernt werden. Nach der Reaktivierung der Proteinsynthese stehen die Produkte des gehemmten Systems wieder zur Verfügung und die markierten Vorstufen können zum funktionellen Enzym assembliert werden (11,12).

b) Eine vorübergehende Inkubation der Zellen mit Chlor - amphenicol vor der Markierung in Gegenwart von Cyclohexi - mid führt zu einer Verlängerung der Assemblierungszeit nach Zugabe des Inhibitors und damit zur Markierung aller mito - chondrial synthetisierten Komponenten (12).

c) In Gegenwart von Cycloheximid erfolgt die Markierung der Membranproteine über einen Zeitraum von 20 min und kommt dann zum Stillstand (51). Eine Pulsmarkierung kann jedoch erreicht werden, wenn die radioaktive Aminosäure nach einer kurzen Markierungsperiode durch Zugabe nicht radioaktiver Aminosäure sehr stark verdünnt wird. Dadurch steht ein großer Teil der markierten Vorstufen-Polypeptide schon kurz nach der Inkubation mit dem Inhibitor zur Ver - fügung und es ist zu erwarten, daß ein größerer Prozent - satz der resistent markierten Vorstufen im funktionellen Enzym erscheinen.

Im Fall der ATPase wurden mit diesen Markierungsmethoden die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse erhalten.

3.4.2. Einbau radioaktiven Leucins in Gegenwart von Cyclo - heximid

Die Zellen wurden in Gegenwart von Cycloheximid mit ^3H - Leucin markiert. Die Markierungsbedingungen sind in Tabel - le 4 angegeben. Die Mitochondrien wurden isoliert. Zur Kon - trolle wurden mit ^{14}C -Leucin markierte Mitochondrien zuge - mischt oder die mitochondrialen Proteine wurden vor der spe - zifischen Markierung homogen mit ^{14}C -Leucin markiert. Die Immunpräzipitate wurden in der Dodecylsulfat-Gelelektropho - rese analysiert.

Tabelle 4

Anreicherung der cycloheximid-resistenten Markierung in der Komponente 9 des ATPase-Komplexes unter verschiedenen Markierungsbedingungen

Spalte A und B: Die Zellen wurden 15 Stunden lang in einer 2 l Kultur gezüchtet und dann 3 Stunden lang mit ^{14}C -Leucin markiert (0,125 mCi/l). Dann wurde die Kultur in zwei gleiche Teile geteilt. Eine Hälfte wurde 30 min lang mit 4 mg pro ml Chloramphenicol inkubiert. Die beiden Kulturen wurden getrennt, jeweils dreimal mit frischem Zuchtmedium gewaschen und für weitere 15 min in jeweils 1 l Zuchtmedium belüftet. Zu den beiden Kulturen wurden 0,1 mg pro ml Cycloheximid gegeben und zwei min danach ^3H -Leucin (2,5 mCi/l). Die Zellen wurden 60 min später geerntet. Die spezifische ^{14}C -Radioaktivität des gesamten Mitochondrienproteins war in beiden Fällen $140\,000 \text{ Imp.} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Spalte C: Die Hyphen wurden (wie oben beschrieben) mit ^{14}C -Leucin markiert und mit Chloramphenicol inkubiert. 2 min nach Zugabe von Cycloheximid wurde ^3H -Leucin hinzugefügt (10 mCi/l) und 2 min später nicht markiertes Leucin (Endkonzentration 5 mM). Die Zellen wurden nach 60 min geerntet. Die spezifische ^{14}C -Radioaktivität des gesamten mitochondrialen Proteins war $150\,000 \text{ Imp.} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Protein- fraktion	Spezifische Radioaktivität ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$ Ver- hältnisse) nach der Markierung in Gegen- wart von Cycloheximid für eine Zeit von		
	60 min	60 min	2 min plus 60 min Chase
	A	B	C
Gesamtes mitochon- driales Protein	1,64 (=1)	2,32 (=1)	0,53 (=1)
Immunpräzipitat	0,2 (0,12)	0,47 (0,2)	0,1 (0,2)
Komponente 9	1,1 (0,7)	5,5 (2,4)	2,0 (3,6)

(aus Abb.7.)

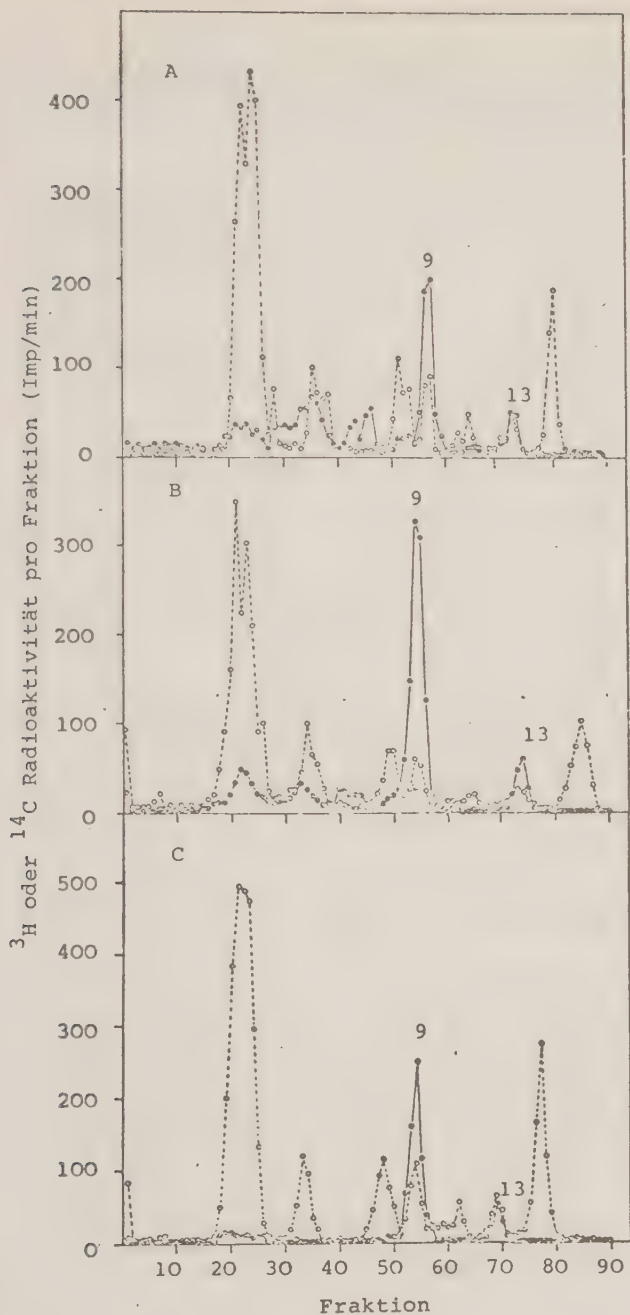
Cycloheximid hemmt den Einbau von ^3H -Leucin in die mit Antiserum gegen $\text{F}_1\text{-ATPase}$ ausgefällten mitochondrialen Proteine (siehe Abb.3. und Tabelle 4, Spalte A). Eine resistente Markierung wird vor allem in den Komponenten 9 und 13 gefunden (Abb. 7 A). Jedoch ist die resistente Markierung in diesen Komponenten, verglichen mit der spezifischen ^3H -Radioaktivität (Verhältnis der ^3H -Radioaktivität zur ^{14}C -Kontrollmarkierung) des gesamten Mitochondrienproteins nie angereichert. Im dargestellten Experiment war der cycloheximid-resistente Einbau in die Komponente 9 zu 30 % gehemmt (Tabelle 4, Spalte A).

Die resistente Markierung, die im Bereich der in der Elektrophorese langsam laufenden Polypeptide beobachtet wird, kann nicht mit der Grundmarkierung korreliert werden. Eine Anreicherung der resistenten Markierung in den beiden Komponenten gegenüber der Markierung des gesamten mitochondrialen Proteins kann jedoch durch die im vorhergehenden Abschnitt geschilderten Experimente erreicht werden:

Eine vorübergehende Inkubation mit Chloramphenicol vor der Markierung in Anwesenheit von Cycloheximid führt (bezogen auf das gesamte Mitochondrienprotein) in der Komponente 9 zu einer Anreicherung der resistenten Markierung um den Faktor 2,4 (Tabelle 4, Spalte B und Abb. 7 B.).

Eine noch stärkere Anreicherung um den Faktor 3,8 wird nach einer Pulse-Chase Markierung erhalten (siehe Tabelle 4, Spalte C und Abb. 7 C.).

Die ^3H -Radioaktivität in den restlichen Fraktionen bleibt nach der Vorinkubation mit Chloramphenicol niedrig und verschwindet nach Pulse-Chase Markierung fast vollständig. Es ist wahrscheinlich, daß diese Markierung durch verunreinigende, mitochondrial synthetisierte Produkte hervorgerufen wird, die in Gegenwart von Cycloheximid nicht assembliert werden können.



(Legende siehe S.30)

Abb. 7. Markierung der Komponenten des mitochondrialen ATPase-Komplexes in Gegenwart von Cycloheximid unter verschiedenen Bedingungen.

Die genauen Markierungsbedingungen sind in Tabelle 4 angegeben. Die Immunpräzipitate wurden isoliert und in der SDS-Gelelektrophorese charakterisiert (a--o). ^{14}C -Kontrollmarkierung, (●--●) Cycloheximid-resistente ^3H -Markierung.

A: Markierung in Gegenwart von Cycloheximid, ohne vorhergehende Inkubation mit Chloramphenicol (Tabelle 4, Spalte A).

B: Markierung in Gegenwart von Cycloheximid, nach vorhergehender Inkubation mit Chloramphenicol (Tabelle 4, Spalte B).

C: Markierung in Gegenwart von Cycloheximid durch Pulsamarkierung, nach vorhergehender Inkubation mit Chloramphenicol (Tabelle 4, Spalte C).

und mit den Polypeptiden der ATPase aggregieren. Dafür spricht, daß bei Alterung der Mitochondrien oder wenn die Mitochondrien bei 37° C solubilisiert werden, die resistente Markierung im Bereich der im Gel langsam wandernden Polypeptide stark zunimmt, ohne daß sich das Markierungsmuster der Kontrolle wesentlich ändert.

Diese Experimente zeigen deutlich, daß in Gegenwart von Cycloheximid zwei Untereinheiten der ATPase markiert werden. Um Hinweise zu erhalten, ob weitere Komponenten zwar synthetisiert, aber nicht assembliert werden können, wurde der Inhibitor ausgewaschen und die Zellen wurden für die

Zeit einer Generation in frischem Kulturmedium gezogen (Abb. 8)

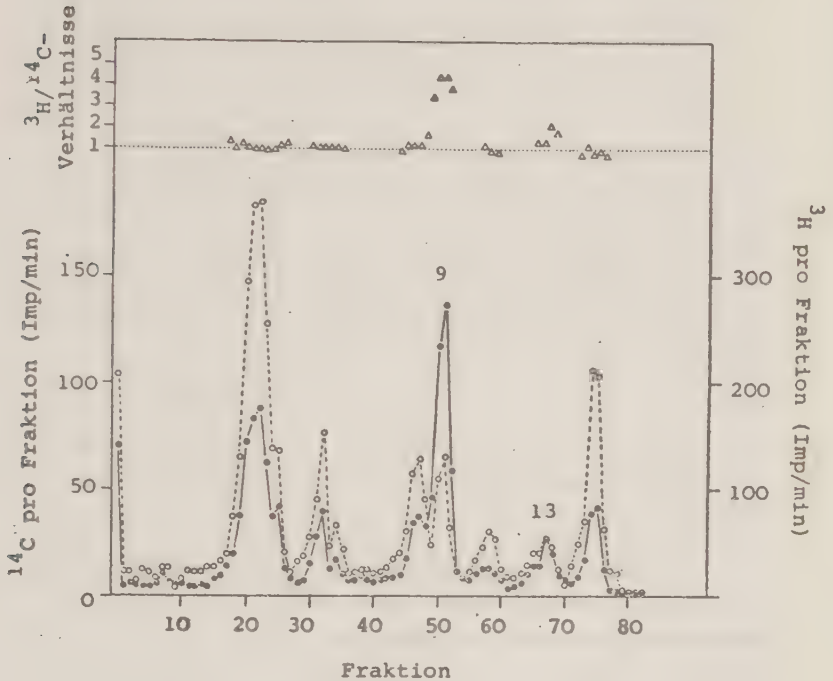


Abb. 8. Die cycloheximid-resistente Markierung der Komponenten der mitochondrialen ATPase nach Auswaschen des Inhibitors und weiterem Wachstum der Zellen.

Eine 15 Stunden alte Zellkultur wurde für 3 h mit ^{14}C -Leucin markiert (0,08 m Ci/l). Nach einer vorübergehenden Inkubation mit Chloramphenicol für 30 min (4mg/ml) wurde Cycloheximid (0,1 mg/ml) zugegeben und 2 min später ^3H -Leucin (1,2 mCi). Nach 60 min wurden die Zellen dreimal mit frischem Kulturmedium gewaschen und für weitere 4 h belüftet. (o--o) ^{14}C -Kontrollmarkierung, (●--●) ^3H -Radioaktivität.

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß in Gegenwart von Cycloheximid nur ein geringer Prozentsatz der radioaktiven Aminosäuren in Proteine der mitochondrialen Innenmembran eingebaut werden. Der größte Teil verbleibt im intrazellulären Leucinpool und kann weder ausgewaschen, noch in ausreichendem Maß durch Zugabe kalten Leucins gebasert werden.

Aus diesem Grund werden nach dem Auswaschen des Inhibitors alle Zellproteine mit der verbleibenden radioaktiven Aminosäure markiert. Diese Markierung erfolgt dabei im gleichen Ausmaß wie die Kontrollmarkierung (12). Aufgrund der spezifischen ^3H -Radioaktivität jedoch kann man ermitteln, welche Komponenten in Gegenwart des Inhibitors markiert werden sind (siehe oberen Teil der Abb.8.).

Wie aus Abb.8. ersichtlich, werden nach dem Auswaschen des Inhibitors nur die Komponenten 9 und 13 spezifisch markiert. Dies bestätigt das Ergebnis der oben beschriebenen Markierungsexperimente.

Die in Gegenwart von Cycloheximid erhaltenen Markierungsmuster zeigen deutlich, daß mindestens 2 Komponenten des ATPase-Komplexes an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden.

3.4.3. Einbau radioaktiven Leucins in Gegenwart von Chloramphenicol

Um zu zeigen, daß außer den beiden Komponenten der ATPase, die in Gegenwart von Cycloheximid markiert werden, alle anderen an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert werden, wurden die Produkte des cytoplasmatischen Systems in Gegenwart von Chloramphenicol, dem Inhibitor der mitochondrialen Proteinsynthese markiert.

Die genauen Bedingungen sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Wie aus Abb. 9 A. ersichtlich ist, hemmt Chloramphenicol den Einbau radioaktiver Aminosäure in die Komponenten 7, 8, 9 und 14. Eine starke Hemmung kann auch in den Komponenten 10 und 13 beobachtet werden.

Da, wie beschrieben (11,12), eine Nichtmarkierung auch darauf zurückgeführt werden kann, daß die Assemblierung des Enzyms in Gegenwart des Inhibitors gehemmt wird, wurde das Chloramphenicol ausgewaschen und die Zellen wurden in frischem Medium kultiviert.

In der Tat (siehe Abb. 9 B.) nimmt die chloramphenicol-resistente Markierung nach dem Auswaschen in den Komponenten 2, 3, 7, 8 und 10 deutlich zu, dagegen bleibt eine 90 %ige Hemmung in der Komponente 9 und eine 50 %ige Hemmung in der Komponente 13 bestehen. Die geringe Hemmung im Fall der Komponente 13 kann dadurch erklärt werden, daß sie in der Elektrophorese nur unvollständig von der Komponente 12 getrennt wird.

Es muß erwähnt werden, daß die spezifische Radioaktivität (das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis) in den Komponenten 7 und 8 nicht den Wert der anderen cytoplasmatisch synthetisierten Komponenten erreicht. Diese verbleibende Hemmung kann nicht damit erklärt werden, daß nach dem Auswaschen des Inhibitors die Zeit zur Assemblierung dieser Komponente nicht ausreichte. In Abwesenheit von Inhibitoren werden alle markierten Polypeptide innerhalb einer Stunde assembliert.

Tabelle 5

Markierung der Komponente 9 der mitochondrialen ATPase in Gegenwart von Chloramphenicol

Die Zellen wurden 15 h lang in einer 2 l Kultur gezüchtet und dann 3 h mit ^{14}C -Leucin markiert (0,125 mCi /l). Dann wurden 4 mg Chloramphenicol pro ml zugegeben und 3 min später ^3H -Leucin (1mCi/l). Nach einer halben Stunde wurde eine Hälfte der Zellen geerntet und die Mitochondrien wurden isoliert. Die andere Hälfte wurde dreimal mit Kulturmedium gewaschen, resuspendiert und für weitere 60 min belüftet.

Das gesamte Mitochondrienprotein hatte eine spezifische ^{14}C -Radioaktivität von $145\,000\text{ Imp.} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Die Immunpräzipitate wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese analysiert (siehe dazu die Abb. 9 A und B).

Proteinfraktionen	spezifische Radioaktivität $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - Verhältnisse)	
	vor dem Auswaschen des Inhibitors	nach
	A	B
Gesamtes Mitochondrienprotein	2,0 (=1)	2,0 (=1)
Immunpräzipitat	1,54 (0,85)	1,9 (0,95)
Komponente 9	0,33 (0,15)	0,2 (0,1)

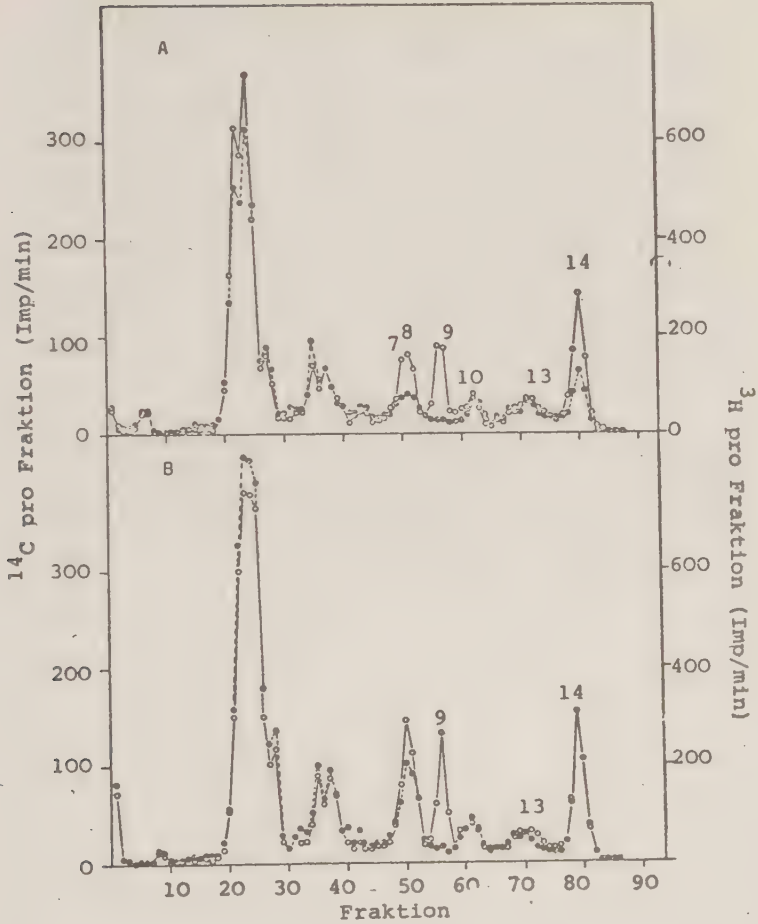


Abb. 9. Chloramphenicol-resistente Markierung der Komponenten des ATPase-Komplexes vor und nach dem Auswaschen des Inhibitors.

Die Mitochondrien wurden, wie in Tabelle 5 beschrieben, markiert und die Immunpräzipitate wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese getrennt, (o--o) ^{14}C -Kontrollmarkierung.

A: (●--●) ^3H -Markierung in Gegenwart von Chloramphenicol

B: (●--●) ^3H -Markierung nach Auswaschen des Inhibitors und weiterem Wachstum der Zellen.

Jedoch wurde in diesen Komponenten keine cycloheximid-resistente Markierung gefunden.

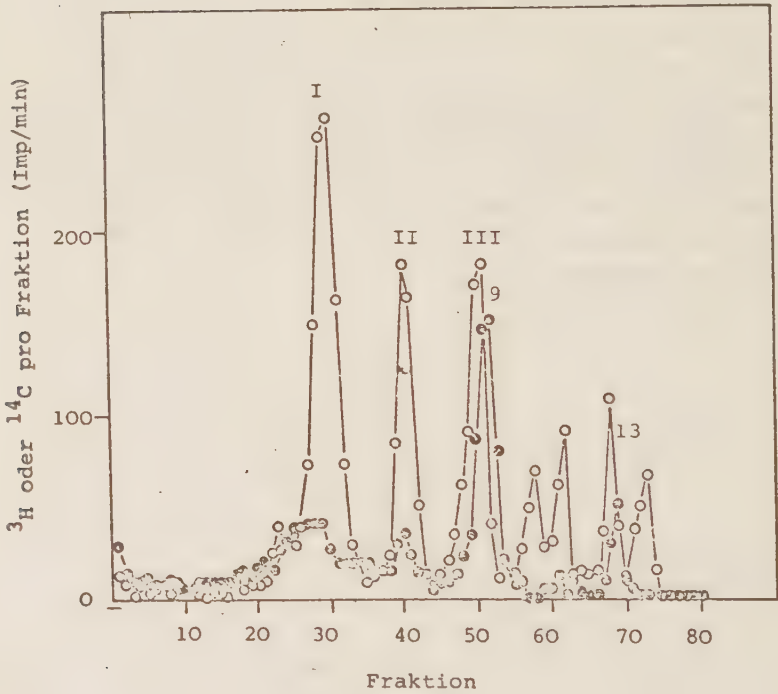
Weiterhin wurde für Rinderherz gezeigt, daß das OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein), das außerhalb der Mitochondrien synthetisiert wird (40), ein Molekulargewicht von ca. 18 000 Dalton hat und nur sehr wenig Histidin enthält. Diese Beschreibung trifft auf die Komponenten 7 und 8 zu (siehe Abb. 5). Deshalb wird vermutet, daß eins davon mit dem OSCP korreliert werden kann und die Hemmung der Markierung nicht darauf beruht, daß die Synthese gehemmt wird, sondern die Assemblierung.

Die Experimente in Gegenwart der spezifischen Inhibitoren zeigen deutlich, daß zwei Komponenten an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden und alle anderen außerhalb der Mitochondrien.

3.5. Vergleich der elektrophoretischen Mobilitäten der mitochondrial synthetisierten Komponenten des ATPase-Komplexes mit denen der Komponenten der Cytochromoxidase .

Die Komponenten I, II, III der Cytochromoxidase aus Neurospora crassa werden in den Mitochondrien synthetisiert (11,12). Die Komponente III hat ein ähnliches Molekulargewicht, wie die Komponente 9 des ATPase-Komplexes. Daraus ergibt sich die Frage, ob die beiden Komponenten identische Proteine sind. Um einen Hinweis dafür zu erhalten, wurde der ATPase-Komplex in Gegenwart von Cycloheximid mit ^3H -Leucin markiert (siehe Tabelle 4 A). Die Cytochromoxidase wurde homogen mit ^{14}C -Leucin markiert. Die beiden Enzymkomplexe wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper isoliert. Die Immunpräzipitate wurden vereinigt und in der SDS-Gelelektrophorese getrennt (Abb.10). Wie ersichtlich, hat die Komponente 9 des ATPase-Komplexes eine geringfügig höhere elektrophoretische Mobilität als die Komponente III der Cytochromoxidase.

Abb. 10. Koelektrophorese einer homogen markierten Präparation der Cytochromoxidase (o--o) und des cycloheximid-resistent markierten Komplexes der mitochondrialen ATPase (●--●)



4. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

4.1. Gelelektrophoretische Charakterisierung der F_1 -ATPase aus Neurospora crassa

Die F_1 -ATPase aus *Neurospora* wurde isoliert und mit Hilfe der Dodacylsulfat-Gelelektrophorese charakterisiert. Das Enzym ist aus einer gleichen Anzahl von Polypeptid-Komponenten mit ähnlichen Molekulargewichten aufgebaut, wie die Präparationen der F_1 -ATPase aus Rinderherz (27,52), Rattenleber (28,53), Schizosaccharomyces pombe (54) und die CF_1 -ATPase aus Chloroplasten (35).

Die drittgrößte Komponente ist jedoch mit einem Molekulargewicht von 36 000 Dalton wesentlich größer als die der in der Literatur beschriebenen Präparationen mit 30 000 Dalton. Dieser Unterschied kann nicht damit erklärt werden, daß bei der Bestimmung der Molekulargewichte unterschiedliche Elektrophoresesysteme verwendet wurden. In unserem Labor wurde die F_1 -ATPase aus Rattenleber präpariert (55) und parallel mit einer Präparation des Enzyms aus *Neurospora* in der Dodacylsulfat-Gelelektrophorese fraktioniert:

Die beiden großen Polypeptidkomponenten haben mit 59 000 und 56 000 Dalton nahezu das gleiche Molekulargewicht wie die der Präparation aus Rattenleber. Dies trifft auch für die beiden großen Komponenten der F_1 -ATPase aus *Saccharomyces* zu (siehe Abb.5.). Dagegen wandert die Komponente 3 (Komponente 6 des ATPase-Komplexes aus *Neurospora*) der F_1 -ATPase aus *Neurospora* in der Gelelektrophorese wesentlich langsamer als die aus Rattenleber (55) und Hefe (Abb.5. und Tabelle 3). Ebenso haben die beiden kleinen Polypeptidkomponenten ein geringfügig größeres Molekulargewicht.

In den Präparationen der F_1 -ATPase aus *Saccharomyces* (19) ist zusätzlich zu diesen 5 Polypeptiden eine Komponente mit dem Molekulargewicht 38 000 vorhanden. Vermutlich handelt es sich dabei um eine Komponente der Oligomycin-sensitiven ATPase, die sehr fest mit der F_1 -ATPase assoziiert ist, aber nicht für die Aktivität der von der Membran abgespalteten F_1 -ATPase notwendig ist. Das gleiche gilt für die beiden kleinen Polypeptid-Komponenten der F_1 -ATPase aus *Neurospora*:

In einigen Präparationen der F_1 -ATPase, die hohe ATPase-Aktivitäten aufweisen, konnten nach der Trennung in der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese keine Polypeptide mit diesen Molekulargewichten nachgewiesen werden.

4.2. Charakterisierung des mit Antiserum gegen F_1 -ATPase präzipitierten ATPase-Komplexes

Antiserum gegen F_1 -ATPase präzipitiert 13-15 % des gesamten mitochondrialen Proteins. Da ungefähr die Hälfte des mitochondrialen Proteins auf die Innenmembran entfällt, kann man abschätzen, daß der ATPase-Komplex mehr als 25 % des Proteins der Innenmembran ausmacht. Der Anteil des Proteins der F_1 -ATPase am präzipitierten Komplex beträgt etwa 60 %. Daraus kann geschätzt werden, daß ebenso wie bei Rinderherz (56) die Innenmembran zu ca 15 % aus F_1 -ATPase besteht. Im Fall von *Saccharomyces* kann mit Antiserum gegen F_1 -ATPase nur etwa 6 % des gesamten mitochondrialen Proteins ausgefällt werden (19). Dies kann damit erklärt werden, daß bei den Experimenten mit Hefe mit reprimierten Zellen gearbeitet wurde, bei denen die Atmungskette nicht voll ausgebildet ist(41).

Die Präzipitation erfolgt durch spezifische Antikörper gegen F_1 -ATPase. Kontrollserum fällt nur minimale Proteinmengen aus. Trotzdem präzipitiert das Antiserum außer den Komponenten der F_1 -ATPase noch mindestens 9 zusätzliche Polypeptide. Daraus wird geschlossen, daß diese Polypeptide

in der Membran sehr fest mit dem Enzym assoziiert sind, da sie bei der relativ hohen Konzentration an Triton (1%) und KCl(0,3M) nicht abgespalten werden. In der Elektrophorese wird ein Bändermuster erhalten, das weitgehend dem der Präparationen der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Rindherz (50) und Hefe (19) ähnelt. Es wird vermutet, daß (wie im Fall der Hefe) das Antiserum den gesamten Komplex der Oligomycin-sensitiven ATPase präzipitiert.

4.3. Über den Ort der Synthese der mit der mitochondrialen ATPase assoziierten Polypeptide

Cycloheximid hemmt, bezogen auf das gesamte Mitochondrienprotein, sehr stark die Markierung des ATPase-Komplexes. Im Fall der Hefe (17) wird die Markierung der Polypeptid-Komponenten vollständig gehemmt.

Vermutlich wird die Assemblierung des Komplexes durch den sehr kleinen Pool eines extramitochondrial synthetisierten Vorstufen-Polypeptids limitiert.

Eine Anreicherung der cycloheximid-resistenten Markierung in zwei Komponenten des Komplexes kann erreicht werden, wenn vor der Markierung vorübergehend mit Chloramphenicol inkubiert wird. Dabei akkumulieren cytoplasmatisch synthetisierte Vorstufen (10) und die Assemblierung verläuft in Gegenwart von Cycloheximid über einen längeren Zeitraum, was zu einem verstärkten Einbau markierter mitochondrialer Produkte in den Komplex führt.

In Gegenwart von Chloramphenicol kann nur eine 15 %ige Hemmung der Markierung des Immunpräzipitats erreicht werden. Die Polypeptiduntereinheiten der F_1 -ATPase werden nahezu resistent markiert, aber auch die übrigen Polypeptide des Komplexes, mit Ausnahme der Komponente 9, enthalten noch einen signifikant hohen Anteil resistenter Markierung.

Daraus kann geschlossen werden, daß in Gegenwart von Chloramphenicol die F_1 -ATPase noch teilweise mit den cytoplasmatisch synthetisierten Polypeptiden assembliert wird und das Antiserum Vorstufen ausfällt.

Die Markierungsexperimente in Gegenwart der spezifischen Inhibitoren der Proteinsynthese führen zur Identifizierung von zwei mitochondrialen Translationsprodukten, die mit der F_1 -ATPase assoziiert sind.

Das mitochondriale Translationsprodukt mit dem Molekulargewicht 19 000 kann in den Doppelmarkierungsexperimenten genau mit der Komponente 9 korreliert werden. Das Verhältnis der cycloheximid-resistenten Markierung zur Kontrollmarkierung ist in allen Fraktionen der Polypeptidbande konstant. Chloramphenicol hemmt die Markierung der Komponente 9 zu 90 %.

Weiterhin kann diese Komponente ebenso wie die mitochondrial synthetisierten Komponenten der Cytochromoxidase schlecht mit Coomassie-Blau angefärbt werden (12,14,57) und das scheinbare Molekulargewicht ist größer, wenn das Protein bei einer höheren Gelkonzentration getrennt wird. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß dieses Polypeptid in den Mitochondrien synthetisiert wird.

Das andere Translationsprodukt hat mit 11 000 Dalton das gleiche Molekulargewicht wie die Komponente 13. Die geringere Anreicherung der cycloheximid-resistenten Markierung und die geringere Hemmbarkeit der Markierung durch Chloramphenicol kann dadurch erklärt werden, daß diese Komponente nicht so deutlich von den übrigen cytoplasmatisch synthetisierten Komponenten getrennt wird wie die Komponente 9. Jedoch wird unter den verschiedenen Markierungsbedingungen ein konstanter Prozentsatz der cycloheximid-resistenten Markierung gefunden und die Markierung wird durch Chloramphenicol zu

50 % gehemmt. Daraus kann geschlossen werden, daß dieses Translationsprodukt in substantiellen Mengen im ATPase-Komplex vorhanden ist.

Es scheint erwähnenswert zu sein, daß eine Reihe von cytoplasmatischen Hefemutanten isoliert wurden (58), deren mitochondriale ATPase nicht mehr oligomycin-sensitiv ist. Die Mutationen, die zur Resistenz führten, lagen auf zwei verschiedenen Genorten.

4.4. Über die Zahl der an mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase

Tzagoloff und Meagher (17) identifizierten in einer Präparation der Oligomycin-sensitiven ATPase aus *Saccharomyces* 4 mitochondriale Translationsprodukte. Es wurden Molekulargewichte von 29 000, 22 000, 12 000 und 7 500 Dalton ermittelt. Der größte Teil der cycloheximid-resistenten Markierung wurde in der Komponente mit dem Molekulargewicht 7 500 gefunden.

Dieses Polypeptid kann mit Chloroform-Methanol extrahiert und durch Dünnschicht-Chromatographie gereinigt werden. Es hat einen ungewöhnlich hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren. Das gleiche Polypeptid konnte aus den gesamten mitochondrialen Membranen extrahiert werden (59).

In der Membran liegt es wahrscheinlich als Polymeres mit einem Molekulargewicht von 45 000 vor, das bei der Inkubation des ATPase-Komplexes mit NaOH (0,2 M) oder HCl (0,2M) depolymerisiert wird (17).

Die Polypeptide mit den Molekulargewichten 22 000 und 12 000 aus der Hefe entsprechen sehr wahrscheinlich den Komponenten 9 und 13 des ATPase-Komplexes aus *Neurospora crassa* (Molekulargewichte: 19 000 und 11 000).

Die Komponente 14 hat zwar mit 9 000 Dalton ein ähnliches Molekulargewicht wie das mitochondriale Translationsprodukt mit 7 500 Dalton und enthält ebenso wie dieses sehr wenig Histidin, es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß Komponente 14 außerhalb der Mitochondrien synthetisiert wird.

Ein mitochondriales Produkt mit diesem Molekulargewicht konnte aus dem ATPase-Komplex von Neurospora nicht mit Chloroform/Methanol extrahiert werden. Auch gelang es nicht, die mitochondrial synthetisierten Komponenten des ATPase-Komplexes durch Inkubation des Immunpräzipitates mit 0,2M NaOH oder 0,2M HCl in kleinere Polypeptide umzuwandeln.

Jedoch konnte aus Mitochondrien von Neurospora mit Chloroform/Methanol ein mitochondrial synthetisiertes Polypeptid extrahiert werden (60), das ein ähnliches Molekulargewicht und eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung hat, wie das von Tzagoloff identifizierte mitochondriale Produkt, das mit der ATPase assoziiert ist (59). Es ist möglich, daß dieses Polypeptid eine Komponente der Oligomycin-sensitiven ATPase ist, die nicht sehr fest an die F_1 -ATPase aus Neurospora gebunden ist und bei der Solubilisierung der Membranen abgelöst wird.

Im Fall der Hefe war eine Identifizierung resistent markierter Produkte erst möglich, wenn das Enzym in vitro aus F_1 -ATPase, OSCP und dem Membranfaktor rekonstituiert wurde oder der ATPase-Komplex mit Antiserum gegen die gesamte Oligomycin-sensitive ATPase präzipitiert wurde. Antiserum gegen F_1 -ATPase fällt keine spezifische cycloheximid-resistente Markierung aus (17). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die markierten mitochondrialen Produkte nicht mit der F_1 -ATPase assoziiert waren und es sich dabei um nicht assemblierte mitochondriale Produkte handelt.

Es wurde nicht nachgewiesen, daß die in den Präparationen der Oligomycin-sensitiven ATPase identifizierten mitochondrialen Produkte tatsächlich für die Funktion des Enzyms notwendig sind. Die beschriebenen Experimente schließen nicht aus, daß es sich dabei um hochmarkierte Polypeptide handelt, die unspezifisch mit dem Protein der ATPase aggregieren.

Aus diesem Grunde halte ich es für nicht erwiesen, daß 4 Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden. Um die Frage zu entscheiden, wieviele Komponenten der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Neurospora crassa mitochondriale Produkte sind, ist es jedoch notwendig, das funktionell aktive Enzym zu präparieren.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Züchtung von Neurospora crassa

Konidien von *Neurospora crassa* (Wildtyp 74 A) wurden in Vogel's Minimalmedium (51) inkubiert (2×10^6 Konidien pro ml). Die Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen bei 25°C belüftet und nach 18 h auf einer Nutsche abgesaugt. Wenn größere Mengen des Pilzes kultiviert wurden, wurden die Kulturen in einer umgebauten Wäscheschleuder abzentrifugiert.

5.2. Markierung der Mycelien

Um eine homogene Markierung der Zellproteine zu erreichen, wurden zu den 15 h alten Kulturen radioaktive Aminosäuren gegeben und die Zellen wurden nach 18 h geerntet. Die Markierungsbedingungen in Gegenwart spezifischer Inhibitoren der Proteinsynthese werden in den Legenden zu den Abbildungen gegeben.

5.3. Isolation der Mitochondrien

Die Hyphen (Ausbeute ca. 10 g Feuchtgewicht pro 1 Zuchtmedium) wurden in 6 Volunina (bezogen auf das Feuchtgewicht w/v) Isolationsmedium (2mM EDTA, 15 % Saccharose, pH 7,5) resuspendiert und in einem Braun Küchenmixer homogenisiert. Die Zellen wurden dann in einer von Weiss et.al. (62) beschriebenen Mühle zerrieben und das Homogenat wurde 10 min bei 1 500 x g zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge Rotor Typen: SS 34 oder GSA). Die Mitochondrien wurden aus dem resultierenden Überstand 30 min bei 10 800 x g (GSA 60 min bei 10 400) sedimentiert, in Isolationsmedium resuspendiert und verunreinigende Zellwände wurden 10 min bei 1500 abzentrifugiert.

Die Mitochondrien wurden aus den Überständen 20 min bei 17 000 x g abzentrifugiert, resuspendiert und bei -18° C aufbewahrt.

5.4. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die ATPase wurde bei 37°C in 0,5 ml Testlösung (10 mM ATP,

5 mM Mg Cl, 0,1 M Tris-azetat, pH 8) gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Aliquots an Enzymlösung gestartet. Die Menge der zugefügten Enzymlösung wurde so gewählt, daß maximal 25 nM Phosphat pro min hydrolysiert wurden. Unter dieser Bedingung ist die Menge des gespaltenen ATP proportional dem Volumen der zugefügten Enzymlösung. Die Reaktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 0,1 ml Trichloressigsäure (50 %) beendet. Das freigesetzte anorganische Phosphat wurde nach einer modifizierten Methode von Fiske und Subarow bestimmt:

Zu den Proben wurden 0,05 ml Reagenz A und 0,1 ml Reagenz B pipettiert. Nach genau 10 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 0,5 ml 2M Tris-Base gestoppt und die Extinktion des entstandenen violetten Farbstoffes bei 578 nm gemessen.

Reagenzlösungen:

Lösung A

15 g Natriumpyrosulfit und 0,2 g Metol (4-methyl-amino-naphthol-pyrosulfit) wurden in 100 ml Wasser gelöst und in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur für maximal 4 Wochen aufbewahrt.

Lösung B

12,5 g Ammoniumheptamolybdat wurden in 100 ml heißem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 125 ml 10 N Schwefelsäure zugefügt und die Lösung wurde durch Zugabe von Wasser auf ein Endvolumen von 250 ml aufgefüllt.

5.5. Präparation der F_1 -ATPase

Die Präparation erfolgte nach einer modifizierten Methode von Senior und Brooks (27) für die Isolation des Enzyms aus Rinderherz.

a) Präparation der mitochondrialen Partikel

Die eingefrorenen Mitochondriensuspensionen (5-10 g Protein) wurden aufgetaut, mit 2M Tris-Base auf pH 7,5 gebracht und 2 h bei 48 000 x g abzentrifugiert. Die Sedimente wur-

den in Sucrose-Tris (10 mM Tris-acetat, 0,25 M Sucrose, 2 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert (20 mg Protein pro ml) und für 10 sec mit Ultraschall behandelt (Branson-Sonifier Modell S-75, Stufe 8).

Das Homogenat wurde 10 min bei 27 000 x g zentrifugiert und die Sedimente wurden erneut wie oben beschrieben mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert.

Die Überstände wurden 60 min bei 78 000 x g zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckmann Spinco 2, Rotortyp Ti 30).

Die Sedimente wurden in STEA-Puffer (0,25 M Sucrose, 10 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, 2 mM ATP, pH 7,5) aufgenommen (20 mg Protein pro ml).

Von nun an erfolgten alle Präparationsschritte bei Temperaturen oberhalb von 18°C:

Die Suspensionen wurden bei Raumtemperatur in 50 ml Portionen beschallt (Stufe 8) bis die Temperatur auf 38-40°C gestiegen war (1-2 min) und 90 min bei 78 000 x g zentrifugiert. Die Partikel wurden in Puffer suspendiert, der 0,25 M Sucrose, 4 mM ATP und 2 mM EDTA, pH 7,5 enthielt.

b) Extraktion der ATPase bei hohem pH mit Hilfe von Ultraschall

Zu den Suspensionen (20 mg Protein pro ml) wurde unter starkem Rühren 1 M Ammoniak-Lösung gegeben, bis der pH auf 9,2 gestiegen war. Es wurde 16 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH wurde erneut auf 9,2 justiert und die Partikel wurden unter Eiskühlung 7,5 min beschallt (Stufe 8). Die Temperatur in den Suspensionen lag zu Beginn der Beschallung bei etwa 20°C und erreichte dann 38-40°C. Die Proben wurden darauf aus dem Kühlbad genommen und solange beschallt, bis die Temperatur auf 50°C gestiegen war.

c) Fraktionierung mit Ammoniumsulfat

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde gesättigte Ammoniumsulfatlösung, pH 7,2, zugegeben, bis eine Sättigung

von 33 % erreicht wurde. Der pH sank dabei auf 7,5 bis 7,2. Unlösliches Material wurde 10 min bei 27 000 x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf 50 %ige Sättigung gebracht. Falls bei dieser Konzentration Protein ausfiel, wurde es wie oben beschrieben abzentrifugiert und verworfen. Das Enzym wurde bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 75 % ausgefällt.

d) Reinigung durch chromatographische Verfahren

Die Sedimente wurden in STEA-Puffer (s. Spalte a) gelöst (20-30 mg Protein pro ml). Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge (Modell 3200, 2 min bei 12 000 x g) entfernt.

Das gelöste Protein (1 ml) wurde auf eine mit STEA-Puffer äquilibrierte Biogel A-05 M Säule aufgetragen (Höhe 150 cm, Durchmesser 1 cm) und in ca. 6 h eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und an DEAE-Zellulose (2 cm x 1 cm) adsorbiert. Das adsorbierte Protein wurde mit 20 ml STEA-Puffer gewaschen. Dann wurde STEA-Puffer, der 0,3M KCl enthielt, eluiert und mit festem Ammoniumsulfat bei 75 % Sättigung ausgefällt. Die Präparationen wurden bei 4°C oder - 18°C als Ammoniumsulfatsuspensionen aufbewahrt.

5.6. Präparation der Cytochromoxidase

Cytochromoxidase wurde nach der Methode von Weiss et.al. (63) durch Affinitätschromatographie an Oleyl-polymethacrylsäure-Harz präpariert.

5.7. Präparation von Antiserum

Die Enzympräparationen (2mg Protein) wurden in 0.2 ml Puffer gelöst (Die F_1 -ATPase in STEA-Puffer, Cytochromoxidase in 50 mM Tris-azetat, pH 7,5) und durch wiederholtes Aufziehen durch eine Injektionskanüle in "Freud's complete adjuvans" emulgiert (1 ml).

Die Emulsionen wurden subkutan an vier verschiedenen Stellen des Rückens erwachsener Kaninchen injiziert. Die Injektionen wurden alle 9 Tage wiederholt. In der Regel wurden den Kaninchen nach 6 Wochen 50-100 ml Blut aus den Ohrvenen entnommen. Zur Gerinnung wurde das Blut für 5 h bei Raumtemperatur in Glasgefäßen aufbewahrt. Der Cruor wurde über Glaswolle abfiltriert. Die restlichen Erythrozyten wurden in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Serum wurde bei - 18°C aufbewahrt.

5.8. Immunpräzipitation

Alle Operationen wurden bei 0-4°C ausgeführt. Die Mitochondriensuspensionen (20-30 mg Protein pro ml) wurden mit Puffer (1% Triton, 0,3M KCl, 10 mM Tris-azetat, pH 7,5) verdünnt, sodaß eine Endkonzentration von 2mg Protein pro ml erreicht wurde. Es wurde 5 min lang in der Tischzentrifuge zentrifugiert. 95 bis 100 % des gesamten mitochondrialen Proteins blieben im Überstand.

Die Überstände wurden mit Antiserum inkubiert.

Nach 2 h wurden die Immunpräzipitate 2 min in der Tischzentrifuge sedimentiert, zweimal mit detergenshaltigem Puffer (1% Triton X-100, 10 mM Tris-azetat, 0,3M KCl, pH 7,5) gewaschen und schließlich mit 10 mM Trispuffer, pH 7,5.

5.9. Dodecylsulfat-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 12,5 %ige Polacrylamidgele verwendet (12), die folgendermaßen polymerisiert wurden: 12,5 g Acrylamid, 0,415 g Bisacrylamid und 0,1 g Ammoniumperoxodisulfat wurden in Elektrophoresepuffer (0,1 M Tris-azetat, 0,5 % Na-Dodecylsulfat (SDS), pH 8) gelöst und mit Puffer auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht. Dazu wurden 0,1 ml Tetramethylen-diamin gerührt. Das Gemisch wur-

de in flache Formen gefüllt, in denen Auftragsspalten vorgeformt waren (Volumen je 20 μ l). Die Gelplatten wurden über Nacht in Elektrophoresepuffer äquilibriert.

Die gewaschenen Immunpräzipitate (ca 50 μ g mitochondriales Protein) wurden in 10-20 μ l Tris-azetat suspendiert und durch Zugabe von Dodecylsulfat-Puffer (Endkonzentration: 2 % Dodecylsulfat, 5 % Mercaptoäthanol, 0,1M Tris, pH 8,5) bei 4°C gelöst und über Nacht aufbewahrt. In einigen Fällen war das Antikörper-Protein sehr fest gebunden und es war notwendig, den Antikörper-Antigenkomplex vor der Zugabe des Dodecylsulfat-Puffers durch 10-minütige Inkubation mit 0,2 M NaOH bei Raumtemperatur zu lösen.

Nachdem das Protein bei 30 mA pro Gel eingewandert war, wurden die Gelplatten mit Plastikfolie abgedeckt und beidseitig gekühlt (12°C). Die Stromstärke wurde auf 60 mA pro Gel heraufgesetzt. Der Stromfluß wurde unterbrochen, wenn eine parallel zum Spalt aufgetragene Probe von Cytochrom c genau 7 cm weit gelaufen war.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung wurden die Gele in 1x10 mm dicke Scheibchen geschnitten und in Dodecylsulfat-Puffer (1 % Dodecylsulfat, 0,1M Tris-azetat) über Nacht bei 60°C geschüttelt. Zu den Proben wurden 15 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben(s.u.) und die Radioaktivität wurde bestimmt.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden parallel zu den Proteinproben Substanzen mit bekannten Molekulargewichten aufgetragen:

Serumalbumin vom Rind (69 000), Katalase (60 000), Aldolase (40 000), Lactatdehydrogenase (36 000), Carboanhydratase (29 000), Trioseisomerase (27 000), β -Lactoglobulin (19 500) und Cytochrom c (11 500).

Um die getrennten Proteinfractionen sichtbar zu machen, wurden die Gele über Nacht mit Coomassie-Brillant-Blue an-

gefärbt (0,25 % Coomassie-Brilliant-Blue in Methanol/Wasser/Eisessig 5/5/1), 8 h im gleichen Lösungsmittel entfärbt und dann in 10 %iger Essigsäure aufbewahrt.

5.10. Radioaktivitätsmessungen

Die Proteinproben wurden in 0,5 ml Dodecylsulfat-Puffer gelöst (0,1M Tris-azetat, 1 % Dodecylsulfat, pH 8) und quantitativ in Scintillationsgläsern überführt, die 15 ml Scintillationsflüssigkeit enthielten (6 g PBD in 400 ml Äthylenglykolmonomethyläther und 600 ml Toluol). Die Messung erfolgte in einem Packard-Tricarb-Scintillationszähler. Die Zählausbeuten betrugen 70 % für ^3H und 18.5 % für ^{14}C .

5.11. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Biuretmethode (64) oder nach der Methode von Lowry et. al. (65) ausgeführt. Als Standard für die Proteinbestimmung wurde Serumalbumin vom Rind verwendet.

5.12. Materialien

Radioaktiv markierte Aminosäuren: Radiochemical Centre, Amersham, England

Cycloheximid: Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.

Chloramphenicol: Bayer, Leverkusen.

ATP, Serumalbumin vom Rind, Katalase, Aldolase, Carboanhydratase, Trioseisomerase, β -Lactoglobulin, Cytochrom c: Böhringer, Mannheim

EDTA, Saccharose (p.A.), Schwefelsäure (p.A.), Essigsäure (p.A.), Tris, Ammoniaklösung, Metol, Salze (p.A.), Lösungsmittel (p.A.): Merck AG, Darmstadt.

Biogel A 0-5 M: Biorad Laboratories, München

Freud's complete adjuvans: Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

DEAE-Zellulose, Ne-Dodecylsulfat, Polyacrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyläthylendiämin, Mercaptoäthanol: Serva GmbH, Heidelberg

PBD: Koch-Light-Laboratories, Colnbrook, England

Äthylenglycolmonomethyläther: Farbwerke Höchst, Gendorf

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die mitochondriale F_1 -ATPase aus Neurospora crassa wurde isoliert und mit Hilfe der Dodecylsulfat-Gelelektrophorese charakterisiert. Die Enzympräparation wird in der Elektrophorese in 5 Polypeptidfraktionen mit den scheinbaren Molekulargewichten 59 000, 55 000, 36 000, 15 000 und 12 000 aufgetrennt.

Antiserum gegen F_1 -ATPase präzipitiert aus Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien zusätzlich zu dem Protein der F_1 -ATPase mindestens 9 Polypeptide. Diese sind sehr fest mit der ATPase assoziiert. Das Polypeptidmuster des ATPase-Komplexes gleicht dem der Präparationen der Oligomycin-sensitiven ATPase aus Rinderherz und Hefe. Es wird geschlossen, daß Antiserum gegen F_1 -ATPase den gesamten Komplex der Oligomycin-sensitiven ATPase ausfällt.

Untersuchungen über den Ort der Synthese der Polypeptid-untereinheiten führten zur Identifizierung von zwei mitochondrialen Translationsprodukten.

Die Komponenten des ATPase-Komplexes mit den scheinbaren Molekulargewichten 19 000 und 11 000 werden in vivo in Gegenwart des spezifischen Inhibitors der extramitochondrialen Proteinsynthese (Cycloheximid), aber nicht in Gegenwart des Inhibitors der mitochondrialen Proteinsynthese (Chloramphenicol) mit radioaktivem Leucin markiert.

Beide Inhibitoren hemmen die Assemblierung des ATPase-Komplexes. Daraus wird geschlossen, daß beide Systeme der Proteinsynthese einen wesentlichen Beitrag zur Biogenese der mitochondrialen ATPase leisten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Ashwell, M. & Work, T.S. (1970), Ann.Rev. Biochem. 39, 251
The Biogenesis of Mitochondria
- (2) Beattie, D.S. (1971), Sub.Cell.Biochem. 1, 1
The Biosynthesis of Mitochondrial Proteins
- (3) Borst, P. (1972), Ann.Rev. Biochem. 41, 333
Mitochondrial Nucleic Acids
- (4) Schatz, G. & Mason, L.(1974), Ann.Rev. Biochem. 43, 51
The Biogenesis of Mitochondrial Proteins
- (5) Sebald, W., Schwab, A.J. & Bücher, Th. (1969), 20-stes
Mosbachkolloquium, Mosbach
- (6) Schweyen, R. & Kaudewitz, F. (1970), Biochem. Biophys.
Res. Commun. 39, 728
Quantitative Estimate of Mitochondrially Governed Proteins
- (7) Slonimsky, P.P. (1953), in 'La formation des enzymes re-
piratoires chez la levure', Paris, Mason
- (8) Schatz, G. (1968), J. Biol.Chem. 243, 2192
Impaired Binding of Mitochondrial Adenosine Triphospha-
tase in the Cytoplasmic "Petite Mutant" of Saccharmy-
ces cerevisiae
- (9) Jagow von, G., Weiss, H. & Klingenberg, M.(1972),Eur.
J. Biochem. 33, 140
Compansion of the Respiratory Chain of Neurospora crassa
Wild-Type and the mi-Mutants mi-1 and mi-2
- (10) Tzagoloff, A.(1970), J. Biol. Chem. 245, 1545
Assembly of the Mitochondrial Membrane System:
II The Synthesis of the Mitochondrial Adenosine Triphospha-
tase, F₁.
- (11) Sebald, W., Weiss, H. & Jackl, G. (1972), Eur. J. Biochem.
30, 413
Inhibition of the Assembly of Cytochrome Oxidase in
Neurospora crassa by Chloramphenicol

- (12) Sebald, W., Machleidt, W. & Otto, J. (1973), Eur.J. Bioch. 38, 311
Products of Mitochondrial Protein Synthesis in Neurospora crassa: Determination of Equimolar Amounts of Three Products in Cytochrome Oxidase on the Basis of Amino Acid Analysis
- (13) Mason, T.L. & Schatz, G. (1973), J. Biol.Chem. 248, 1355
Cytochrome c Oxidase from Baker's Yeast: Site of Translation of the Protein Components
- (14) Rubin, M.S. & Tzagoloff, A.(1973), J. Biol. Chem. 248, 4275
Assembly of the Mitochondrial Membrane System: X Mitochondrial Synthesis of Three of the Subunit Proteins of Yeast Cytochrome Oxidase
- (15) Tzagoloff, A. (1971), J.Biol. Chem. 246, 3050
Assembly of the Mitochondrial Membrane System: IV Role of Mitochondrial and Cytoplasmic Protein Synthesis of the Rutamycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase
- (16) Weiss, H. & Zigarke, B.(1974), Eur.J. Bioch.41, 63
Cytochrome b in Neurospora crassa Mitochondria : Site of Translation of the Heme Protein
- (17) Tzagoloff, A. & Maegher, P. (1972), J. Biol.Chem.247, 594
Assembly of the Mitochondrial Membrane System: VI Mitochondrial Synthesis of Subunit Proteins of the Rutamycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase
- (18) Senior, A.E. (1973), Biochim. Biophys. Acta 301, 249
The Structure of Mitochondrial ATPase
- (19) Tzagoloff, A. & Meagher, P. (1971), J. Biol.Chem. 246, 7328

Assembly of the Mitochondrial Membrane System: V Properties of a Dispersed Preparation of the Rotenone-Sensitive Adenosine Triphosphatase of Yeast Mitochondria

- (20) Kagawa, Y., & Racker, E. (1966), J. Biol. Chem. 241, 2467
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: IX Reconstitution of Oligomycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase
- (21) Tzagoloff, A., Byington, K.H. & Mac Lennan, D.H. (1968), J. Biol. Chem. 243, 2405
Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System: II The Isolation and Characterization of an Oligomycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase from Bovine Heart Mitochondria
- (22) Swanljung, P. & Frigeri, L. (1972), Biochim. Biophys. Acta 283, 391
Affinity Chromatography of Mitochondrial ATPase Dispersed with Triton X-100
- (23) Tzagoloff, A. (1969), J. Biol. Chem. 244, 5020
Assembly of the Mitochondrial Membrane System: I Characterization of some Enzymes of the Inner Membrane of Yeast Mitochondria
- (24) Penefsky, H.S. & Warner, R.C. (1965), J. Biol. Chem. 240, 4694
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: VI Studies on the Mechanism of Cold Inactivation of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase
- (25) Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. & Racker, E. (1960), J. Biol. Chem. 235, 3322
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: I Purification and Properties of Soluble Dinitrophenol-Stimulated Adenosine Triphosphatase

- (26) Mac Lennan, D.H., Smoly, J.P. & Tzagoloff, A. (1969), J. Biol. Chem. 243, 1589
Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System: I Restauration of Adenosine Triphosphatase in Salt Extracted Submitochondrial Particels ,
- (27) Senior, A.E. & Brooks, J.C. (1970), Arch. Biochim. Biophys. Acta 140, 257
Studies on the Mitochondrial Oligomycin-Insensitive ATPase: An Improved Method of Purification and the Behaviour of the Enzyme in Solutions of Various Depolymerizing Agents
- (28) Lambeth, D.O. & Lardy, H.A. (1971), Eur.J.Biochem. 22, 355
Purification and Properties of Rat-Liver-Mitochondrial Adenosine Triphosphatase
- (29) Caterall, W.A. & Pedersen, P.L. (1971), J.Biol. Chem. 246, 4987
Adenosine Triphosphatase from Rat Liver: I Purification, Homogeneity and Physical Porperties
- (30) Schatz, G., Penefsky, H.S. & Racker, E. (1967), J. Biol. Chem. 242, 2552
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: Interaction of Purified Mitochondrial Adenosine Triphosphatase from Baker's Yeast with Submitochondrial Particles from Beef Heart
- (31) Kagawa, Y. & Racker, E. (1966), J.Biol.Chem. 241, 2475
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phopsphoryletion: X Correlation of Morphology and Function in Submitochondrial Particles

- (32) Rapacker, E. & Horstman, L.L. (1967), J. Biol. Chem. 242, 2547
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: VIII Structure and Function of Sub-mitochondrial Particels Completely Resolved with Respect to Coupling Factor I
- (33) Lambeth, D.O., Lardy, H.A., Senior, A.E. & Brooks, J.C., (1971), FEBS Lett. 17, 330
Reassessment of the Molecular Weight of Mitochondrial ATPase from Beef Heart
- (34) Schnebli, H.P., Vatter, A.E. & Abrams, A. (1970), J. Biol. Chem. 245, 1122
Membrane Adenosine Triphosphatase from Streptococcus faecalis: I Molecular Weight, Subunit Structure, and Amino Acid Composition
- (35) Farron, F. (1970), Biochemistry 9, 3823
Isolation and Properties of a Chloroplast Coupling Factor and Heat-activated Adenosine Triphosphatase
- (36) Mac Lennan, D.H. & Tzagoloff, A. (1968), Biochemistry 7, 1603
Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System: IV Purification and Characterization of the Oligomycin-Sensitivity Conferring Protein
- (37) Senior, A.E. (1971), Bioenergt. 2, 141
On the Relationship between the Oligomycin-Sensitivity-Conferring Protein and other Mitochondrial Coupling Factors
- (38) Mac Lennan, D.H. & Asai, J. (1968), Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 441
Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System: V Localization of the Oligomycin-Sensitivity Conferring Protein

- (39) Tzagoloff, A., Mac Lennan, D.H. & Byington, K.H. (1968), *Biochemistry* 7, 1596
Studies on the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase System: III Isolation from the Oligomycin-Sensitive Adenosine Triphosphatase Complex of the Factors which Bind F_1 and Determine Sensitivity of Bound F_1
- (40) Tzagoloff, A. (1969), *J. Biol. Chem.* 245, 1545
Assembly of the Mitochondrial Membrane System: III Function and Synthesis of the Oligomycin-Sensitivity Conferring Protein of Yeast Mitochondria
- (41) Tzagoloff, A., Rubin, M.S. & Sierra, M.F. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 301, 71
Biosynthesis of Mitochondrial Enzymes
- (42) Lamb, A.J., Clark-Walker, G.D. & Linnane, A.W. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* 161, 415
The Biogenesis of Mitochondria: 4. The Differentiation of Mitochondrial and Cytoplasmic Protein Synthesizing System in vitro by Antibiotics
- (43) So, A.G. & Davie, E.W. (1963), *Biochemistry* 2, 132
The Incorporation of Amino Acids into Protein in a Cellfree System from Yeast
- (44) Wintersberger, E. (1965), *Biochem. Z.* 341, 409
Proteinsynthese in isolierten Hefe-Mitochondrien
- (45) Pullman, M.E. & Monroy, G.C. (1963), *J. Biol. Chem.* 238, 3762
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: I A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase
- (46) Horstman, L.L. & Racker, E. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 1336
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: XXII Interaction Between Mitochondrial Adenosine Triphosphatase Inhibitor and Mitochondrial Adenosine Triphosphatase

- (47) Racker, E. & Horstman, L.L.(1970), J. Biol.Chem. 242 2547
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation.
- (48) Sebald, W. & Jackl, G., unveröffentliche Ergebnisse
- (49) Swanljung, P., Frigeri, L., Ohlson, K. & Ernster, L. (1973), Biochim.Biophys. Acta 305, 519
Studies on the Activation of Purified Mitochondrial ATPase by Phospholipide
- (50) Capaldi, R.A. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun.53 1331
On the Subunit Structure of Oligomycin Sensitive ATPase
- (51) Schwab, A.J., Sebald, W. & Weiss, H.(1972), Eur.J. Biochem. 30, 413
Different Pool Sizes of the Precursor Polypeptides of Cytochrome Oxidase from Neurospora crassa
- (52) Senior, A.E. & Brooks, J.C. (1971), FEBS Lett.17,327
The Subunit Composition of the Mitochondrial Oligo - mycin-Insensitive ATPase
- (53) Caterall, W.A., Coty, W.A. & Pedersen, P.L.(1973), J.Biol.Chem. 248, 7427
Adenosine Triphosphatase from Rat Liver Mitochondria III: Subunit Composition
- (54) Goffeau, A., Landry, Y., Foury, F. & Briquet, M.(1973), J. Biol.Chem.248, 7097
Oligomycin Resistance of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase in a Pleiotropic Chromosomal Mutant of a "Petite-Negative" Yeast, Schizosaccharomyces pombe
- (55) Sebald, W., unveröffentliche Ergebnisse
- (56) Slater, E.C., Rosing, J., Harris, D.A., van de Stadt, R.C. & Kemp, Jr. A.(1974), in:
"Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation", Azzone, G.F., Klingenberg, M.E., Quegliariello, E. & Siliprandi, N.(Edts.), North Holland

The Identification of Functional ATPase in
Energy-Transducing Membranes

- (57) Mason, T.L., Poyton, R.O., Wharton, D.C. & Schetz, G.
(1973), J. Biol. Chem. 248, 1346
Cytochrom c Oxidase from Baker's Yeast: I Isolation
and Properties
- (58) Griffith, D.E., Houghton, R.L. & Lencashire, W.E.
(1974), in "The Biogenesis of Mitochondria",
Academic Press, Inc. (Kroon, A.M. & Saccone (Edts.)).
Mitochondrial Genes and ATP-Synthetase
- (59) Sierra, M.F. & Tzagoloff, A. (1973), Proc. Nat. Sci. USA
70, 3155
Assembly of the Mitochondrial Membrane System. Purification of a Mitochondrial Product of the ATPase
- (60) Michel, R., Liebl, A., Machleidt, W., Otto, J.,
Neupert, W.
Isolation and Characterization of a Mitochondrial
Synthesized Polypeptide from Neurospora crassa
- (61) Vogel, H.J. (1956), Microbiol. Genet. Bull. 13, 42
A Convenient Growth Medium for Neurospora
- (62) Weiss, H., Jagow v.G., Klingenberg, M. & Bücher, Th.
(1970), Eur. J. Biochem. 14, 75
Characterisation of Neurospora crassa Mitochondria
Prepared with a Grind Mill
- (63) Weiss, H., Sebald, W. & Bücher, Th. (1971), Eur. J.
Biochem. 22, 19
Cycloheximid Resistent Incorporation of Amino Acids
into a Polypeptide of the Cytochrome Oxidase of
Neurospora crassa

- (64) Beisenhertz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czock, R., Garbade, K.H., Mayer-Arendt, E. & Pfeleiderer, G. (1953), Z. Naturforschung, 8b, 555
Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd - Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerol - phosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
- (65) Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.L. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent

LEBENS LAUF:	Gerhard Anton Jackl,
18. März 1944	geboren in Klášterec nad Ohří, ČSR, als Sohn des Gerbermeisters Anton Jackl und seiner Frau Maria, geb. Hentsch
31. Dezember 1944	Der Tod des seit Februar im Rußlandfeldzug vermißten Vaters wurde im Jahre 1962 vom Amtsgericht Essen auf diesen Tag festgelegt
Herbst 1950 bis Februar 1954	Besuch der Grundschule im Landkreis Erfurt, DDR
Juli 1954 bis Ostern 1955	Besuch der Volksschule in Essen
Ostern 1955 bis 1965	Besuch des neusprachlichen Leibniz -Gymna- siums in Essen-Altenessen
Februar 1965	Abschluß der Reifeprüfung
Mai 1965 bis August 1966	Studium der Mathematik an der Philipps- Universität Marburg
November 1966	Beginn des Studiums der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Dezember 1968	Abschluß der Diplom-Vorprüfung
Dezember 1970	Abschluß der mündlichen Diplomhauptprüfung im Fach Biologie
Dezember 1970 bis Dezember 1971	Ausführung einer Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität München (Leitung Prof. F. Kaudewitz)

Seit Dezember 1971

Ausführung einer Doktorarbeit unter
der Anleitung von Herrn Dr. Sebald am
Institut für Physiologische Chemie und
Physikalische Biochemie der Universität
München (Leitung Prof. Dr. Th.Bücher)
,

